

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292418 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2021.04.11

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD47 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 202010282924.0

(32) 2020.04.10

(33) CN

(86) PCT/CN2021/086339

(87) WO 2021/204281 2021.10.14

(71) Заявитель:
ХАТЧИСОН МЕДИФАРМА
ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:

Цай Юй, Ян Ичжэнь, Ли Сён, Ян
Сяньвэнь, Жэнь Юнсинь, Су Вэй-Го
(CN)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, способ их получения и применение для лечения или предотвращения связанных с CD47 заболеваний.

202292418

A1

A1

202292418

АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD47 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая заявка основана и испрашивает приоритет на основании заявки
5 CN202010282924.0, которая была подана 10 апреля 2020 г. и содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки во всех отношениях.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В соответствии с настоящим изобретением предложено антитело, в частности,
10 антитело против CD47, и его применение для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения связанных с CD47 заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD47 (кластер дифференцировки 47) изначально идентифицировали в 1980-х
15 как опухолевый антиген рака яичников человека. CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген рака яичников OА3, Rh-родственный антиген и MER6, представляет собой множество раз пронизывающий мембрану рецептор, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов, который содержит один иммуноглобулин-подобный домен и пять пронизывающих
20 мембрану областей. В качестве лиганда сигнального регуляторного белка α (SIRP α), CD47 связывается с V-подобным доменом на NH₂-конце SIRP α . SIRP α экспрессируется, главным образом, на клетках костного мозга, включая макрофаги, гранулоциты, дендритные клетки (ДК), тучные клетки и их предшественники, например, гематopoэтические стволовые клетки. CD47 на нормальных клетках
25 связывается с SIRP α на макрофагах, в результате чего высвобождается сигнал «не ешь меня», и, тем самым, ингибируется фагоцитарная функция макрофагов. Это важный механизм, с помощью которого макрофаги отличают свое от чужого во врожденной иммунной системе. CD47 широко экспрессируется на опухолевых клетках и тканях человека, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ),
30 хронический гранулоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), множественную миелому (ММ), рак мочевого пузыря и другие солидные опухоли. Опухолевые клетки ускользают от фагоцитоза

макрофагами посредством связывания экспрессированного на высоком уровне CD47 с SIRP α на поверхности макрофагов, что способствует росту опухоли. Иммунную контрольную точку CD47 считают мишенью, которая потенциально эффективна и может широко применяться для иммунотерапии опухоли. На данный момент, разработаны различные специфичные блокаторы для нацеливания на взаимодействие CD47/SIRP α . Ведется множество доклинических и клинических испытаний, которые относятся к лекарственным средствам, включая антитела против CD47 и слитые белки SIRP α для лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза и солидных опухолей на поздней стадии.

Эти лекарственные средства вводят либо отдельно, либо в комбинации с другими противоопухолевыми лекарственными средствами. Если взять в качестве примера антитело против CD47 Hu5F9, разработанное компанией Forty Seven, в I фазе клинического испытания по оценке эффекта Hu5F9 при лечении 22 пациентов с лимфомой, комбинация Hu5F9 и ритуксимаба могла вызвать объективную ремиссию у 50% пациентов, которые не отвечали на ритуксимаб отдельно. В соответствии с клиническими данными, опубликованными в 2019 г., процент пациентов с полной ремиссией из 14 пациентов с рецидивирующим/рефрактерным острым миелоидным лейкозом, которых лечили Hu5F9 в комбинации с азациитидином, составлял до 36%, и процент пациентов с ремиссией из 11 пациентов с синдромом подавления функции костного мозга, которых лечили Hu5F9 в комбинации с азациитидином, составлял до 55%.

В соответствии с настоящим изобретением предложены новое антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые обладают высокой противоопухолевой активностью и не вызывают значительной агглютинации красных кровяных клеток (эритроцитов). Следовательно, настоящее изобретение может удовлетворить больше клинических потребностей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD47 или его фрагментом, и способ их получения и применения, включая способ лечения связанных с CD47 заболеваний.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех HCDR, выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, варибельной области тяжелой цепи (VH), причем последовательность аминокислот VH является таковой, как
5 представлена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7.

В одном аспекте, антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат от одного до трех HCDR, выбранных из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, причем HCDR1 содержит
10 последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, и HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, или 17, или 21.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело против CD47
15 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех LCDR, выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, варибельной области легкой цепи (VL), причем последовательность аминокислот VL является таковой, как представлена SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело против CD47
20 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех LCDR, выбранных из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 15, или 18, или 22, и LCDR3 содержит
25 последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат три CDR варибельной области тяжелой цепи (VH), т.е., HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три CDR варибельной области легкой цепи (VL), т.е., LCDR1,
30 LCDR2 и LCDR3, причем последовательность аминокислот VH является таковой, как представлена SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7, и последовательность аминокислот VL является таковой, как представлена SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат три CDR вариабельной области тяжелой цепи (VH), т.е., HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три CDR вариабельной области легкой цепи (VL), т.е., LCDR1,

5 LCDR2 и LCDR3; причем VH и VL выбраны из:

(1) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2;

10 (2) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, 9 или 10;

15 (4) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9 или 10; или

(5) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в
20 SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 и определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи
25 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, или 17, или 21, LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в
30 SEQ ID NO: 14, LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 15, или 18, или 22, и LCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 17, LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 18, и LCDR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область легкой цепи (VL), причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7, причем указанная VL содержит

последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его
5 антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот,
10 представленной в SEQ ID NO: 7, причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его
15 антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем VH и VL выбраны из

(1) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в
20 SEQ ID NO: 2;

(2) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ
25 ID NO: 5, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, 9 или 10;

(4) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9 или 10; или

30 (5) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность
5 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную
10 область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную
15 область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную
20 область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную
25 область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим

изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9.

5 В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, и причем указанная VL содержит
10 последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность
15 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную
20 область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим
25 изобретением, содержат переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его
30 антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат константную область тяжелой цепи, причем указанная константная область тяжелой цепи представляет собой, например, константную

область IgG1 человека, константную область IgG4 человека, константную область IgG4P человека или константную область IgG1TM человека. Константная область IgG4P человека в соответствии с настоящим изобретением представляет собой мутантную константную область IgG4 человека, которая содержит замену
5 аминокислоты S228P (пронумерована согласно EU). В некоторых вариантах реализации константная область IgG1TM человека представляет собой мутантную константную область IgG1 человека, которая содержит замены аминокислот L234F, L235E и P331S (пронумерованы согласно EU).

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его
10 антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат константную область легкой цепи, такую как константная область κ или λ человека.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой моноклональное антитело. В некоторых
15 вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой антитело мыши, химерное антитело или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере часть каркасной
20 последовательности антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой консенсусную каркасную последовательность человека. В одном варианте реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий
фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, представляют
25 собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело, такое как VHH, Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')₂, одноцепочечное антитело, такое как scFv, Fv, dAb (доменное антитело) или би/мульти-специфичное антитело.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует любое антитело против CD47 или его
30 антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, причем предпочтительно указанная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь или легкую цепь, или переменную область тяжелой цепи или

вариабельную область легкой цепи антитела в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор или вектор экспрессии, содержащий одну или более нуклеиновых кислот, предложенных в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный вектор подходит для рекомбинантной продукции любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой вектор экспрессии.

10 В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, или рекомбинантных векторов, или векторов экспрессии, предложенных в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены иммуноконъюгат или 15 иммунная слитая молекула, содержащие антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD47 или его антигенсвязывающий 20 фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, и необязательно содержащая по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как носитель или вспомогательное вещество.

25 В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения связанных с CD47 заболеваний, указанный способ включает введение субъекту эффективного количества любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данной заявке, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина, предложенных в соответствии с настоящим 30 изобретением, иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы, предложенных в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтической композиции, предложенной в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящего изобретения также предложено применение антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением при получении лекарственных средств для лечения или предотвращения связанных с CD47 заболеваний.

5 В некоторых вариантах реализации связанные с CD47 заболевания включают различные типы гематологического рака и солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь перечисленными: рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, лимфомы, лейкоз, множественную миелому, (злокачественную) меланому, лейомиому, лейомиосаркомы, глиому, глиобластому, 10 миелому, рак эндометрия, карциному почки, (доброкачественную) меланому, рак предстательной железы, карциному щитовидной железы, рак шейки матки, рак желудка и рак печени.

Антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением также можно комбинировать с другими 15 терапевтическими агентами или терапевтическими методами для лечения или предотвращения связанных с CD47 заболеваний.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением можно применять для обнаружения белка CD47 в образце, или для диагностики/детектирования 20 связанных с CD47 заболеваний.

В объем настоящего изобретения также входят любые комбинации любых вариантов реализации, описанных в данной заявке. Любые варианты реализации или любые их комбинации, описанные в данной заявке, применимы к любому и ко всем антителам против CD47 или фрагментам, способам и их применениям в 25 соответствии с настоящим изобретением, описанным в данной заявке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фигуре 1 показана активность связывания антитела HMA02h14-48 с CD47 на поверхности клеток Raji.

30 На Фигуре 2 показана активность связывания антитела HMA02h14-48 с CD47 на поверхности клеток Toledo.

На Фигуре 3 показана аффинность связывания антитела HMA02h14-48 с CD47 на поверхности клеток REC-1.

На Фигуре 4 показана активность антитела HMA02h14-48 в отношении блокирования взаимодействия между CD47 и SIRP α человека.

5 На Фигуре 5 показано действие антитела HMA02h14-48 на фагоцитоз клеток Raji посредством МФ человека.

На Фигуре 6 показано действие антитела HMA02h14-48 на фагоцитоз клеток Toledo посредством МФ человека.

10 На Фигуре 7 показано действие антитела HMA02h14-48 на фагоцитоз клеток REC-1 посредством МФ человека.

На Фигуре 8 показано действие антитела HMA02h14-48 на фагоцитоз клеток HL-60 посредством МФ человека.

На Фигуре 9 показано действие антитела HMA02h14-48 на агглютинацию эритроцитов *in vitro*.

15 На Фигуре 10 показана способность антитела HMA02h14-48 связываться с CD47 на поверхности эритроцитов человека.

На Фигуре 11 показано ингибирование роста опухоли Toledo посредством Hu5F9 и HMA02h14-48.

20 На Фигуре 12 показано ингибирование роста опухоли REC-1 посредством Hu5F9 и HMA02h14-48.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением предложены антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут блокировать
25 взаимодействие между CD47 и SIRP α , обладают высокой противоопухолевой активностью и не вызывают значительной реакции агглютинации эритроцитов.

Антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, проявляют ингибиторную активность, такую как ингибирование экспрессии CD47 (такую как
30 ингибирование экспрессии CD47 на поверхности клетки), активности и/или передачи сигналов CD47, или блокирование взаимодействия между CD47 и SIRP α . Антитело против CD47, предложенное в соответствии с настоящим изобретением,

полностью или частично снижает или регулирует экспрессию или активность CD47 после связывания или взаимодействия с CD47 (таким как CD47 человека). После взаимодействия между антителом и полипептидом и/или пептидом CD47 человека, биологическая функция CD47 полностью, значительно или частично снижается или регулируется. По сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 без взаимодействия (например, связывания) с антителом против CD47, описанным в данной заявке, уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела против CD47 снижается по меньшей мере на 95% (например, снижается на 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), и, в этом случае, считают, что антитело способно полностью ингибировать экспрессию или активность CD47. По сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 без взаимодействия (например, связывания) с антителом против CD47, описанным в данной заявке, уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела против CD47 снижается по меньшей мере на 50% (например, снижается на 55%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90%), и, в этом случае, считают, что антитело против CD47 способно значительно ингибировать экспрессию или активность CD47. По сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 без взаимодействия (например, связывания) с антителом против CD47, описанным в данной заявке, уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела против CD47 снижается менее чем на 95% (например, снижается на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90%), и, в этом случае, считают, что антитело способно частично ингибировать экспрессию или активность CD47.

При сравнении уровня взаимодействия между CD47 и SIRP α в присутствии антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в соответствии с настоящим изобретением, с уровнем взаимодействия между CD47 и SIRP α в отсутствие антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данной заявке, антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением блокируют взаимодействие между CD47 и SIRP α по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по

меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%.

Антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением не вызывают значительного уровня агглютинации клеток, например, антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением не вызывает значительного уровня агглютинации эритроцитов. В некоторых вариантах реализации, если уровень агглютинации эритроцитов в присутствии антитела против CD47 в соответствии с настоящим изобретением снижен по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации эритроцитов в присутствии антитела против CD47 Hu5F9 из известного уровня техники, то это свидетельствует о том, что антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением не вызывает значительного уровня агглютинации эритроцитов.

По сравнению с антителом, известным в данной области техники, антитело, предложенное в соответствии с настоящим изобретением также в значительной степени эффективно в модели опухоли. В некоторых вариантах реализации антитело, предложенное в соответствии с настоящим изобретением, может в значительной степени ингибировать рост опухоли. В некоторых вариантах реализации объем опухоли в присутствии антитела в соответствии с настоящим изобретением ингибируется по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% или 100%, по сравнению с таковым в отсутствие указанного антитела. Например, способность макрофагов фагоцитировать опухолевые клетки в присутствии антитела против CD47 в соответствии с настоящим изобретением повышена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с таковой в присутствии антитела против CD47 из известного уровня техники.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способ получения антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, и применение указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения или предотвращения типов рака и т.д.

Определения

Если не указано иное, настоящее изобретение будут осуществлять, применяя обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в рамках технических возможностей в данной области техники.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, определения некоторых научных и технических терминов приведены далее. Если в других местах в данной заявке в прямой форме не приведено иное определение, все научные и технические термины, используемые в данной заявке, имеют значения, которые обычно понимают средние специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Касательно определений и терминов в данной области техники, специалисты могут обратиться к Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). Аббревиатура аминокислотного остатка представляет собой стандартный 3-буквенный и/или 1-буквенный код, используемый в данной области техники по отношению к одной из 20 широко используемых L-аминокислот. Форма единственного числа, используемая в данной заявке (включая формулу изобретения), включает соответствующую форму множественного числа, если в явном виде не указано иное.

Термин «приблизительно» означает значение или композицию в пределах приемлемого диапазона ошибок конкретного значения или композиции, который определит средний специалист в данной области техники, который отчасти зависит от того, как измеряют или определяют значение или композицию, т.е., от ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» может относиться к диапазону в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы,

«приблизительно» может относиться к диапазону до 5%, 10% или 20% (т.е., $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 20\%$).

При использовании для соединения двух или более необязательных единиц, термин «и/или» следует понимать как означающий любую одну из необязательных
5 единиц или любые две или более необязательных единиц.

В данной заявке термин «содержать» или «включать» означает включение упомянутых элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любых других элементов, целых чисел или этапов. В данной заявке, когда используют термин «содержать» или «включать», если не указано иное, в его объем также входят
10 случаи, состоящие из упомянутых элементов, целых чисел или этапов. Например, при упоминании вариабельной области антитела, «содержащей» определенную последовательность, также предполагается, что в объем данного термина входит вариабельная область антитела, состоящая из указанной определенной последовательности.

15 Термины «интегрин-ассоциированный белок (IAP)» или «CD47», когда их используют в данной заявке, относятся к любому природному CD47, происходящему из любого позвоночного, включая млекопитающих (таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы)), если не указано иное. В объем указанного термина входит «полноразмерный» непротессированный
20 CD47 и любая форма CD47 или любой его фрагмент, образованный путем внутриклеточного процессинга. В объем указанного термина также входят встречающиеся в природе варианты CD47, такие как варианты сплайсинга или аллельные варианты. В некоторых вариантах реализации CD47 относится к полноразмерному CD47 или его фрагменту (такому как его зрелый фрагмент, в
25 котором нет сигнального пептида) из человека. В некоторых вариантах реализации CD47 человека относится к CD47, идентичному последовательности аминокислот, представленной в NCBI под номером доступа NP_001768.1, или ее фрагменту. В некоторых вариантах реализации в объем указанного термина также входят слитый белок, содержащий CD47 или его фрагмент.

30 «SIRP α » означает сигнальный регуляторный белок α дикого типа, или рекомбинантный или нереконбинантный полипептид, содержащий последовательность аминокислот сигнального регуляторного белка α дикого типа,

или природный или встречающийся в природе аллельный вариант сигнального регуляторного белка α .

Термин «антитело против CD47», «анти-CD47», «антитело CD47» или «антитело, которое связывается с CD47» относится к антителу или его 5 антигенсвязывающему фрагменту, которые способны связываться с белком CD47 или его фрагментом с достаточной аффинностью, чтобы антитело было полезно в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на CD47. В некоторых вариантах реализации антитело против CD47, предложенное в данной заявке, имеет константу диссоциации (K_D) ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 10 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,9$ нМ или $\leq 0,8$ нМ. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полноразмерным CD47 человека или его фрагментом (особенно его внеклеточным связывающим фрагментом). В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком, содержащим 15 полноразмерный CD47 или его фрагмент. В некоторых других вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD47 или его фрагментом, экспрессированным на поверхности клетки.

Термин «аффинность» в данной заявке относится к силе общей суммы всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы 20 (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, в данной заявке «аффинность связывания» относится к свойственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно выразить 25 константой диссоциации (K_D). Примеры способов анализа, известных в данной области техники, для определения аффинности связывания включают поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE) или сходные методики (например, ForteBio).

Термин «связанное с CD47 заболевание» в данной заявке относится к 30 нефизиологическому состоянию, связанному с экспрессией, или функцией, или активностью CD47, или с активностью передачи сигналов, опосредованных CD47, включая, но не ограничиваясь типами рака. В некоторых вариантах реализации при

указанных заболеваниях будет польза от блокирования связанной с CD47 передачи сигналов.

Термины «иммунный ответ» или «иммунная реакция» можно использовать взаимозаменяемо в данной заявке, и они относятся к действию, например, лимфоцитов, антигенпредставляющих клеток, фагоцитов, гранулоцитов, и действию указанных клеток или печени, приводящему к продукции растворимых макромолекул (включая антитела, цитокины и молекулы системы комплемента). Указанное действие приводит к селективному нарушению, разрушению или элиминированию инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или нормальных клеток или тканей человека в случае аутоиммунных реакций или патологического воспаления, из организма человека.

Термин «передача сигнала» в данной заявке относится к биохимической причинно-следственной связи, которая обычно вызывается белок-белковым взаимодействием, таким как связывание CD47 с его рецептором, указанная связь приводит к передаче сигналов от одной части клетки в другую часть клетки. Как правило, передача включает специфичное фосфорилирование одного или более остатков тирозина, серина или треонина на одном или более белках в серии реакций, что вызывает передачу сигнала. Предпоследний процесс, как правило, включает события в ядре, посредством которых вызываются изменения в экспрессии генов.

Термины «активность» и «биологическая активность» или термины «биологическое свойство» и «биологическая особенность (признак)» используют взаимозаменяемо в данной заявке, и они включают, но не ограничены перечисленными: аффинность и специфичность к эпитопу/антигену, способность нейтрализовать или антагонизировать активность CD47 *in vivo* или *in vitro*, усиление или активацию активности CD47, IC₅₀, стабильность *in vivo* антитела и иммуногенность антитела. Другие определяемые биологические свойства или особенности антител, известные в данной области техники, включают, например, перекрестную реактивность (т.е., перекрестную реактивность, как правило, с не являющимися человеческими гомологами целевых пептидов, или с другими белками или тканями), и способность поддержания высоких уровней экспрессии антител в клетках млекопитающих. Свойства или особенности, упомянутые выше,

можно наблюдать, определить или оценить, применяя методики, хорошо известные в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными: твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), сортировку клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или анализ методом плазмонного резонанса BIACORE, анализ нейтрализации *in vitro* или *in vivo*, связывание с рецептором, продукцию и/или секрецию цитокинов или факторов роста, передачу сигнала и иммуногистохимию срезов тканей из различных источников (включая людей, приматов или любые другие источники).

Термин «антитело» в данной заявке относится к любой форме антитела, обладающей желательной биологической активностью. Следовательно, его используют в наиболее широком смысле, включая, но не ограничиваясь перечисленными: моноклональное антитело (включая полноразмерное моноклональное антитело), поликлональное антитело, мультиспецифичное антитело (такое как биспецифичное антитело), гуманизированное антитело, антитело человека, химерное антитело, антитело CrossMab или верблюдизированное однодоменное антитело.

Термины «целое антитело», «полноразмерное антитело» и «интактное антитело» используют взаимозаменяемо в данной заявке, и они относятся к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (далее сокращенно называют VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (далее сокращенно называют VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Область VH и область VL можно дополнительно разделить на гипервариабельный участок (представляющий собой определяющий комплементарность участок (CDR)), среди которого рассредоточен более консервативный участок (представляющий собой каркасный участок (FR)). «Определяющий комплементарность участок», или «участок CDR», или «гипервариабельный участок», или «CDR» представляет собой участок в вариабельном домене антитела, который гипервариабелен по последовательности и образует петлю с определенной структурой

(«гипервариабельную петлю») и/или содержит остаток, контактирующий с антигеном («точку контакта с антигеном»). CDR преимущественно отвечает за связывание с эпитопами антигена. CDR тяжелой цепи и легкой цепи, как правило, называют CDR1, CDR2 и CDR3, которые пронумерованы последовательно, начиная с N-конца. CDR, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, называют HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, тогда как CDR, расположенные в вариабельном домене легкой цепи антитела называют LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно. Каждая VH или VL состоит из трех CDR и 4 FR, которые расположены в следующем порядке от аминоконца к карбоксильному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Константная область непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но проявляет множество эффекторных функций.

В данной последовательности аминокислот VH или VL, точную границу последовательности аминокислот каждого CDR можно определить, используя любую одну из различных хорошо известных схем или их комбинацию, включая, например: схему Чотиа (Chothia et al., «Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins», *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987)); схему Кабата (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ое издание, Министерство здравоохранения и социального обеспечения США, Национальные институты здравоохранения (1987)), AbM (Университет Бата) и Contact (Университетский колледж Лондона); схему North (North et al., «A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations», *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)). Границу CDR антитела против CD47 в соответствии с настоящим изобретением можно определить в соответствии с любыми схемами, известными в данной области техники, или их комбинацией, и личной оценкой.

Легкую цепь антитела можно классифицировать на один из двух типов (называют каппа (κ) и лямбда (λ)) на основании последовательности аминокислот ее константного домена. Тяжелую цепь антитела можно преимущественно подразделить на 5 различных типов в соответствии с последовательностью аминокислот в зависимости от константной области тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, - и некоторые из этих типов можно дополнительно подразделить на подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

«Антитело в виде IgG» относится к форме IgG константной области тяжелой цепи антитела. Например, антитело в виде IgG4 означает, что константная область его тяжелой цепи происходит из IgG4.

Термин «моноклональное антитело» в данной заявке относится к антителу, 5 полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., различные антитела, составляющие указанную популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного эпитопа. Напротив, обычные препараты 10 (поликлональных) антител, как правило, содержат большое количество антител, направленных против различных эпитопов (или специфичных к различным эпитопам). Определение «моноклональное» указывает на особенность антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должен толковаться как требующее какого-либо конкретного способа получения 15 указанного антитела.

В объем термина «антигенсвязывающий фрагмент» антитела в данной заявке входят фрагменты или производные антитела. Как правило, антигенсвязывающий фрагмент включает по меньшей мере один фрагмент (такой как один или более CDR) антигенсвязывающей области или вариабельной области антитела, и у него 20 сохраняются по меньшей мере некоторые из свойств связывания антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничены перечисленными: фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, sc-Fv); и нанотела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Когда 25 активность связывания антигена выражена на основании расчета молярной концентрации, у связывающих фрагментов или производных, как правило, сохраняется по меньшей мере 10% активности связывания антигена от таковой у антитела, из которого они произошли. Предпочтительно, у связывающих фрагментов или производных сохраняется по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 30 90%, 95% или 100% или более активности связывания антигена от таковой у антитела, из которого они произошли.

Ожидается, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот, которые значительно не изменяют его биологическую активность (называют «консервативными вариантами» или «функционально консервативными вариантами» антитела). В предпочтительном аспекте, консервативные замены получают в результате консервативных замен остатков, показанных ниже в Таблице А, предпочтительно, предпочтительных консервативных замен остатков аминокислот, показанных в Таблице А.

Таблица А

Исходный остаток	Пример замены	Предпочтительная консервативная замена аминокислоты
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

10

Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сближенных третичной укладкой белка.

Термин «выделенное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент» в данной заявке относится к очищенному состоянию антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, «выделенный» может

15

означать, что указанная молекула по существу свободна от других биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, сахара или другие вещества, такие как обломки клеток и ростовая среда. Тем не менее, специалисту в данной области техники известно, что термин «выделенный» не означает полное отсутствие таких 5 веществ или отсутствие воды, буфера или соли, если только они не присутствуют в количестве, которое значительно препятствует экспериментальному или терапевтическому применению антител, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь чистоту более 95%, более 96%, более 97%, более 98% или 10 более 99%, указанную чистоту определяют, например, с помощью электрофореза (например, ЭФ в ПААГ/ДСН, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Обзор способов оценки чистоты антител см., например, в Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87.

15 Термин «химерное антитело» в данной заявке относится к антителу, содержащему переменный домен первого антитела и константный домен второго антитела, причем указанные первое антитело и второе антитело происходят из различных видов. Как правило, переменный домен получают из антитела экспериментальных животных, таких как грызуны, тогда как последовательность 20 константного домена получают из антитела человека, так что полученное химерное антитело с меньшей вероятностью вызовет нежелательный иммунный ответ у людей, чем антитело из экспериментальных животных.

Термин «гуманизированное антитело» в данной заявке относится к форме антитела, содержащей последовательности из антитела человека и из не 25 являющегося человеческим антитела (например, мыши, крысы). Обычно, гуманизированное антитело содержит по меньшей мере один, и как правило два, переменных домена, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют таковым из не являющихся человеческими иммуноглобулинов, и все или по существу все каркасные (FR) области 30 соответствуют таковым из иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc), происходящую из иммуноглобулина человека. В некоторых случаях,

известных специалисту в данной области техники, можно ввести мутации аминокислот в гуманизированные антитела (например, в переменные домены, каркасные области и/или константные области (если они присутствуют)), например, чтобы улучшить некоторые свойства антител; такие формы антител все еще входят
5 в объем термина «гуманизированное антитело» в соответствии с настоящим изобретением.

Специалисту в данной области техники известно, что антитело может содержать сахарную цепь из клетки, продуцирующей указанное антитело. Например, при продуцировании в мышах, в клетках мыши или в гибридах,
10 происходящих из клеток мыши, антитело может содержать сахарную цепь из мыши. В качестве альтернативы, при продуцировании в крысах, в клетках крысы или в гибридах, происходящих из клеток крысы, антитело может содержать сахарную цепь из крысы.

Термин «Fc-область» в данной заявке используют в качестве определения C-
15 концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. В объем указанного термина входит Fc-область с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Fc-область с нативной последовательностью охватывает различные встречающиеся в природе последовательности Fc иммуноглобулина, такого как различные подтипы Ig, и его
20 аллогенные Fc-области (Gestur Vidarsson et al., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 октября 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.) В одном варианте реализации Fc-область тяжелой цепи IgG человека распространяется от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Тем не менее, лизин на C-конце (Lys447) Fc-области может присутствовать или нет.
25 Если в данной заявке не указано иное, аминокислотные остатки в Fc-области или константной области пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, также называемой EU-индексом, описанной в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ое издание, Министерство здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, 1991.

30 Термины «вариант Fc-области» или «вариантная Fc-область» используют взаимозаменяемо в данной заявке, и они означают, что содержится модифицированная Fc-область, относительно Fc-области с нативной

последовательностью. Вариантам Fc-области в соответствии с настоящим изобретением дают определения в соответствии с модификациями аминокислот в аминокислотах, из которых они состоят.

Термин «фармацевтическое вспомогательное вещество» относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному)), вспомогательному веществу, носителю или стабилизатору, и т.д., которые вводят с активным веществом.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к такой композиции, которая находится в виде, которая позволяет биологической активности активного ингредиента, содержащегося в ней, быть эффективной, и не содержит дополнительных ингредиентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для субъекта, которому вводят указанную композицию.

В данной заявке «иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одним или более другими веществами, включая, но не ограничиваясь цитотоксическими агентами или метками. «Иммунная слитая молекула» представляет собой антитело, которое слито путем ковалентного соединения с одним или более другими пептидами или полипептидами.

В объем термина «терапевтический агент», описанного в данной заявке, входят любые вещества, которые эффективно предотвращают или лечат соответствующие заболевания, такие как типы рака.

Термин «цитотоксический агент», используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клетки и/или вызывает гибель или разрушение клетки.

«Химиотерапевтические агенты» включают химические низкомолекулярные лекарственные средства, которые пригодны для лечения типов рака или болезней иммунной системы.

Термин «низкомолекулярное лекарственное средство» относится к органическому соединению с низкой молекулярной массой, которое может регулировать биологические процессы. «Малой молекулой» («низкомолекулярным соединением») называют молекулу с молекулярной массой менее 10 кДа, как правило, менее 2 кДа и предпочтительно менее 1 кДа. Малые молекулы включают, но не ограничены перечисленными: неорганические молекулы, органические

молекулы, органические молекулы, содержащие неорганический компонент, молекулы, содержащие радиоактивный атом, синтетические молекулы, пептидомиметики и миметики антител. В качестве терапевтического агента, малые молекулы лучше проникают в клетки, чем большие молекулы, менее подвержены
5 деградации и менее вероятно запустят иммунный ответ.

Термин «иммуномодулятор» в данной заявке относится к природному или синтетическому активному агенту или лекарственному средству, которое регулирует (подавляет или усиливает) иммунный ответ. Иммунный ответ может представлять собой гуморальный ответ или клеточный ответ. Иммуномодулятор
10 включает иммунодепрессант. В некоторых вариантах реализации иммуномодулятор включает активный агент или лекарственное средство, которые усиливают иммунный ответ, например, активный агент или лекарственное средство, которые пригодны для усиления противоракового иммунного ответа при лечении рака.

«Иммунодепрессант», «иммуносупрессорное лекарственное средство» или «иммуносупрессор» в данной заявке представляет собой терапевтический агент для ингибирования или предотвращения активностей иммунной системы при иммуносупрессивной терапии.
15

Термины «карцинома» и «рак» описывают или относятся к физиологическим расстройствам у млекопитающих, для которых, как правило, характерен неконтролируемый рост клеток. Это определение включает доброкачественные и злокачественные типы рака и покоящиеся опухоли или микрометастазы. «Рак» включает, но не ограничен солидными опухолями и гематологическим раком. Примеры различных типов рака включают, но не ограничены карциномой,
20 лимфомой, бластомой, саркомой и лейкозом.

Термин «вектор» в данной заявке относится к любым рекомбинантным полинуклеотидным конструкциями, которые можно применять с целью трансформации (т.е., внедрения гетерологичной ДНК в клетки-хозяева). Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая является кольцевой петлей
30 двухцепочечной ДНК, при использовании которой дополнительные фрагменты ДНК можно лигировать в указанную петлю. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, при использовании которого дополнительные фрагменты

ДНК можно лигировать в вирусный геном. Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина после внедрения в клетку-хозяина, и посредством этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы могут направлять экспрессию генов, которые функционально связаны. Такие векторы называют в данной заявке «вектором экспрессии». Вектор экспрессии относится к нуклеиновой кислоте, которая может реплицироваться и экспрессировать целевой ген, когда указанным вектором трансформируют, трансфицируют или трансдуцируют клетку-хозяина. Вектор экспрессии содержит один или более фенотипических селектируемых маркеров и точки начала репликации, чтобы гарантировать сохранение вектора и обеспечить амплификацию в хозяине, при необходимости.

Термин «субъект», или «пациент», или «индивид» в данной заявке включает любого человека или не являющегося человеком животного. В объем термина «не являющееся человеком животное» входят все позвоночные, такие как млекопитающие и не млекопитающие, такие как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, куры, амфибии, рептилии, и т.д.

Термины «терапевтически эффективное количество», «терапевтически эффективная доза» и «эффективное количество» в данной заявке относятся к количеству антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, которое эффективно предотвращает или улучшает симптомы одного или более заболеваний или состояний или развитие заболеваний или состояний, когда его предоставляют клеткам, тканям или субъектам, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами. Терапевтически эффективная доза также относится к количеству антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которого достаточно, чтобы привести к улучшению симптомов, такому как количество для лечения, излечения, предотвращения или улучшения соответствующих медицинских состояний или для увеличения скорости лечения, излечения, предотвращения или улучшения таких

состояний. Когда указанный активный ингредиент вводят индивиду отдельно, терапевтически эффективная доза относится только к указанному ингредиенту. При введении в комбинации, терапевтически эффективная доза относится к общему количеству активных ингредиентов, вносящих вклад в терапевтические действия, независимо от того, вводят ли их в комбинации, последовательно или одновременно. Эффективное количество терапевтического агента приведет к повышению диагностических критериев или параметра по меньшей мере на 10%, как правило, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50%.

В данной заявке «лечение» включает 1) терапевтические меры, которые излечивают, облегчают и ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или заболевания и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или заболевания, и 2) предупредительные или профилактические меры, которые предотвращают и/или облегчают развитие патологического состояния или заболевания. Следовательно, субъект, получающий указанное лечение, включает индивида, который страдал от заболевания, индивида, который имеет предрасположенность к заболеванию, и индивида, который хочет предотвратить заболевание. В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено лечение заболевания или состояния. В некоторых других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено предотвращение заболевания или состояния.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, «лечение» заболевания или состояния относится к улучшению заболевания или состояния (т.е., облегчению, или предотвращению, или уменьшению прогрессирования заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В некоторых других вариантах реализации «лечение» относится к ослаблению или улучшению по меньшей мере одного параметра организма, включая такие физические параметры, которые могут быть незаметны для пациента. В некоторых других вариантах реализации «лечение» относится к регулированию заболевания или состояния физически (например, стабилизация видимых симптомов),

физиологически (например, стабилизация параметров организма), или обоими путями. Способы оценки лечения и/или предотвращения заболевания, как правило, известны в данной области техники, если они явно не описаны в данной заявке.

В других вариантах реализации настоящего изобретения, «предотвращение»
5 заболевания или состояния включает ингибирование возникновения или развития заболевания или состояния или симптома конкретного заболевания или состояния. В некоторых вариантах реализации субъект с семейным анамнезом рака является кандидатом для профилактической схемы приема. Как правило, в контексте рака, термин «предотвращение» относится к введению лекарственных средств субъекту
10 до начала состояний или симптомов рака, в частности, у субъекта с риском развития рака.

В некоторых вариантах реализации после «лечения» рака с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением, считают, что отдельного пациента успешно лечат, если у указанного индивида наблюдают одно или более из
15 следующего: количество раковых клеток уменьшилось или раковые клетки полностью исчезли; размер опухоли уменьшился; инфильтрация раковых клеток в периферические органы ингибирована или отсутствует, включая, например, распространение раковых клеток в мягкие ткани и кости; метастазирование опухоли ингибировано или отсутствует; рост опухоли ингибирован или
20 отсутствует; один или более симптомов, связанных с определенным раком, ослаблены; заболеваемость и смертность снижены; качество жизни улучшено; заболеваемость опухолью, частота возникновения или онкогенность снижены; количество или встречаемость раковых стволовых клеток в опухоли снижены; опухолевые клетки дифференцированы в неонкогенное состояние; или
25 комбинацию некоторых из указанных эффектов.

«Ингибирование роста опухоли» относится к любому механизму, посредством которого можно ингибировать рост опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем замедления пролиферации опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток
30 ингибируют путем остановки пролиферации опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем уничтожения опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток

ингибируют путем индукции апоптоза опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем индукции дифференцировки опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем лишения опухолевых клеток питательных веществ. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем предотвращения миграции опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем предотвращения инвазии опухолевых клеток.

В данной заявке «идентичность последовательностей» относится к степени идентичности последовательностей, определенной на основании последовательного сравнения нуклеотидов или аминокислот в окне сравнения. «(Процент) идентичности последовательностей» можно рассчитать, как описано далее: сравнение двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определение количества положений с одинаковым основанием нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или одинаковым аминокислотным остатком (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) в двух последовательностях с получением количества совпадающих положений, деление количества совпадающих положений на суммарное количество положений в окне сравнения (т.е., размер окна) и умножение результата на 100, с получением процента идентичности последовательностей. Оптимального выравнивания с целью определения процента идентичности последовательностей можно добиться различными способами, известными в данной области техники, например, используя общедоступные компьютерные программы, такие как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN (DNASTAR). Специалисты в данной области способны определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей или целевого участка последовательностей, который сравнивают. В настоящем изобретении, для последовательностей антител, процент идентичности последовательностей аминокислот определяют путем оптимального выравнивания кандидатной последовательности антитела с контрольной последовательностью антитела, а затем осуществления оптимального

выравнивания в соответствии с правилом нумерации на Кабату в предпочтительном варианте реализации.

Термин «агглютинация» в данной заявке относится к слипанию клеток, а термин «гемагглютинация» относится к слипанию определенного класса клеток (т.е., эритроцитов). Следовательно, гемагглютинация представляет собой тип агглютинации.

Контрольное антитело «Hu5F9» в данной заявке представляет собой антитело против CD47 в виде IgG4P, образованное путем рекомбинантной экспрессии в GenScript в соответствии с последовательностью вариабельной области 5F9, описанной в патенте US 2015/0183874 A1. Контрольное антитело «SRF231» представляет собой антитело против CD47 в виде IgG4P, образованное путем рекомбинантной экспрессии в GenScript в соответствии с последовательностью вариабельной области 2.3D11, описанной в патенте US 20180201677 A1.

15 Антитело против CD47 и его получение.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением можно получить с помощью любого подходящего способа получения антитела. Любую подходящую форму CD47 можно использовать в качестве иммуногена (антигена) для получения антитела. В качестве примера, но не ограничения, любой вариант CD47 или его фрагмент можно использовать в качестве иммуногена. В некоторых вариантах реализации клетки гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела мыши против CD47 человека можно получить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Указанные способы включают, но не ограничены гибридной технологией, изначально разработанной Kohler et al., (1975) (Nature 256: 495-497). Предпочтительно, в соответствии со стандартным протоколом, выделяли клетки селезенки мыши и осуществляли слияние с линией клеток миеломы мыши с помощью ПЭГ или электрослияния. Затем проводили скрининг клеток гибридомы, секретирующих антитело с активностью связывания CD47. Последовательность ДНК вариабельной области иммуноглобулина клеток гибридомы в соответствии с настоящим изобретением можно детектировать с помощью способа на основе ПЦР с вырожденными праймерами.

Антитела из грызунов (таких как мыши) могут вызывать нежелательную иммуногенность антитела, когда их используют в качестве терапевтических средств *in vivo*. Повторное применение вызывает иммунный ответ на терапевтические антитела у людей. Этот вид иммунного ответа по меньшей мере
5 приведет к утрате терапевтической эффективности и, в тяжелых случаях, приведет к потенциально летальной аллергической реакции. Один способ снижения иммуногенности антител грызунов включает получение химерных антител, в которых переменную область антитела мыши соединяют с константной областью антитела человека (Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-43). Тем не
10 менее, сохранение интактных переменных областей из грызунов в химерных антителах все еще может вызывать опасную иммуногенность у пациентов.

Прививку CDR с переменной области грызуна на каркас человека (т.е., гуманизирование) использовали, чтобы дополнительно минимизировать последовательность грызуна. Для гуманизированного антитела в соответствии с
15 настоящим изобретением, участки CDR мыши можно встроить в зародышевый каркас человека, применяя способ, известный в данной области техники. См. Winter et al., патент США № 5,225,539, и Queen et al., патент США US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,762 и US 6,180,370. Тем не менее, обмен петлями CDR не позволяет получить антитело с таким же свойством связывания, что и у исходного
20 антитела. В гуманизированном антителе часто требуется дополнительно заменить каркасные остатки (FR) (остатки, участвующие в поддержании петли CDR) для сохранения аффинности связывания антигена. Kabat et al. (1991) J. Immunol. 147: 1709. Вкратце, процесс превращения антитела в гуманизированное включает следующие этапы: А. последовательность гена каждого кандидатного антитела
25 выравнивают с последовательностью гена зародышевого антитела человека, чтобы найти последовательность с высокой гомологией; В. аффинность HLA-DR анализируют и изучают, чтобы выбрать зародышевую каркасную последовательность человека с низкой аффинностью; С. каркасные последовательности аминокислот переменной области и окружающей ее области
30 анализируют, применяя технологию компьютерного моделирования и молекулярную стыковку, и исследуют их пространственный стереоскопический способ связывания. Путем вычисления силы электростатического взаимодействия,

силы Ван-дер-Ваальса, гидрофильности и энтропии, анализируют ключевые отдельные аминокислоты, которые могут взаимодействовать с CD47 и поддерживать пространственный каркас, в последовательности генов кандидатного антитела, и прививают их обратно на зародышевый ген выбранного каркаса человека, положения аминокислот в каркасной области, которые необходимо сохранить, отмечают исходя из этого, и синтезируют гуманизированное антитело.

Точную границу последовательности аминокислот CDR вариабельной области антитела в соответствии с настоящим изобретением можно определить, применяя любую одну из множества хорошо известных схем, таких как схем Кабата, Чотиа, AbM, Contact или North. Следует отметить, что граница вариабельного участка CDR одного и того же антитела, полученная с помощью различных систем определений, может отличаться. То есть, последовательности CDR вариабельной области одного и того же антитела, определенные с помощью различных систем нумерации, различны. Следовательно, когда речь идёт об определении антитела с определенной последовательностью CDR, в соответствии с определением, приведенным в настоящем изобретении, в объем термина «антитело» также входит антитело, последовательность вариабельной области которого содержит указанную определенную последовательность CDR. Тем не менее, вследствие применения различных схем (таких как различные системы нумерации или их комбинации), граница заявленного CDR отлична от границы конкретного CDR, в соответствии с определением в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах реализации границу CDR в молекуле антитела против CD47, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, определяют на основании системы нумерации по Кабату.

Антитела с различными специфичностями (т.е., различными сайтами связывания для различных антигенов) содержат различные CDR. Тем не менее, хотя CDR отличаются от антитела к антителу, лишь ограниченное число положений аминокислот в CDR непосредственно вовлечены в связывание антигена. Минимальную перекрывающуюся область можно определить, используя по меньшей мере два из способов Кабата, Чотиа, AbM и North, чтобы получить «минимальную связывающую единицу» для связывания антигена. Минимальная связывающая единица может представлять собой подгруппу CDR. Специалист в

данной области техники поймет, что остатки остальной части последовательности CDR можно определить в соответствии со структурой и белковой укладкой антитела. Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением также предложены любые варианты CDR, представленные в данной заявке. В некоторых вариантах реализации, в варианте CDR антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, аминокислотный остаток минимальной связывающей единицы может оставаться неизменным, тогда как остатки остальной части CDR, соответствующие определениям по Кабату или IMGT, можно заменить на консервативные аминокислотные остатки.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат от одного до трех HCDR, выбранных из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, причем HCDR1 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 11, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 11, HCDR2 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 12, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 12, и HCDR3 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 13, или SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 13, или SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат от одного до трех LCDR, выбранных из определяющего

комплементарность участка 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем LCDR1 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 14, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, LCDR2 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 22, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 22, и LCDR3 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 16, или содержит по меньшей мере 1 и не более чем 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах реализации формулировка «антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением», также распространяется на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в трех CDR вариабельной области тяжелой цепи которого, по сравнению с указанными тремя CDR, конкретно описанными в данной заявке, содержится всего по меньшей мере одно и не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены), и/или в трех CDR вариабельной области легкой цепи которого, по сравнению с указанными тремя CDR, в частности, описанными в данной заявке, содержится всего по меньшей мере одно и не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 изменение аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены).

В некоторых вариантах реализации формулировка «антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением», также распространяется на такие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в которых, по сравнению с вариабельной областью

тяжелой цепи и/или вариабельной областью легкой цепи антитела, конкретно описанными в данной заявке, присутствует одно или более (предпочтительно не более чем 10, более предпочтительно не более чем 6, 5, 4, 3, 2 или 1) изменений аминокислот (предпочтительно замен аминокислот, более предпочтительно консервативных замен аминокислот) в вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, и предпочтительно, указанное изменение аминокислоты не происходит в участке CDR.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7. В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

В варианте реализации настоящего изобретения, изменения аминокислот, описанные в данной заявке, включают замены, вставки или делеции аминокислот. Предпочтительно, изменения аминокислот, описанные в данной заявке, представляют собой замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены.

В предпочтительном варианте реализации изменения аминокислот в соответствии с настоящим изобретением происходят на участках вне CDR (например, в FR). Более предпочтительно, изменения аминокислот в соответствии с настоящим изобретением происходят на участках вне вариабельной области тяжелой цепи и/или вне вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изменения аминокислот происходят в константной области тяжелой цепи и/или в константной области легкой цепи.

В некоторых вариантах реализации антитела в соответствии с настоящим изобретением, содержащие изменения аминокислот, обладают свойствами, сопоставимыми или сходными с таковыми у конкретных антител, описанных в данной заявке.

5 В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением содержит посттрансляционные модификации в CDR, переменных областях легкой цепи, переменных областях тяжелой цепи, легких цепях или тяжелых цепях.

10 В некоторых вариантах реализации антитело против CD47, предложенное в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело, такое как VHH, антитело Fab, антитело Fab', Fab'-SH, антитело (Fab')₂, одноцепочечное антитело, такое как scFv, Fv, dAb (доменное антитело) или би/мульти-специфичное антитело.

15 В некоторых вариантах реализации антитело против CD47, предложенное в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой любое антитело в виде IgG, такое как антитело в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело в виде IgG4P, т.е., введена модификация Ser228Pro (S228P, пронумерованы согласно EU) в шарнирную
20 область константной области IgG4 человека, чтобы избежать или снизить обмен цепей.

В некоторых вариантах реализации одну или более модификаций аминокислот можно ввести в Fc-область антитела, предложенную в соответствии с настоящим изобретением, для получения вариантов Fc-области. Вариант Fc-области может
25 содержать последовательность Fc-области человека (такой как Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую модификации (такие как замены) аминокислот в одном или более положениях аминокислот, например, несколько модификаций в IgG1 человека, чтобы повысить или снизить его связывание с FcγR и повысить или снизить соответствующую функцию, приведены в статье Bruhns и
30 Jönsson, опубликованной в Immunol Rev. Ноябрь 2015 г.; 268 (1): 25-51, стр. 44.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD47, предложенное в соответствии с настоящим изобретением, содержит вариант Fc-области, который

проявляет активность связывания FcγR, которая снижена или недостаточна. В некоторых вариантах реализации указанный вариант Fc-области содержит замены аминокислот, и, в частности, указанные замены аминокислот выбраны из других замен аминокислот в положениях E233, L234, L235, N297 и P331 тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации замены аминокислот варианта Fc-области представляют собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S.

В некоторых вариантах реализации антитело, предложенное в настоящей заявке, модифицировано, чтобы повысить или снизить степень гликозилирования антитела. Добавления или удаления сайтов гликозилирования антитела можно удобно добиться путем изменения последовательности аминокислот таким образом, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования. Гликозилирование можно изменить, например, чтобы повысить аффинность антитела к «антигену». Эту модификацию можно осуществить, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно ввести одну или более замен аминокислот, что приведет к удалению одного или более сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, посредством чего удаляют гликозилирование в указанном сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность антитела к антигену. Такой способ описан, например, в патенте США № 5,426,300. Когда антитело содержит Fc-область, сахараиды, присоединенные к ней, можно изменить. При некоторых применениях пригодны модификации для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, такие как удаление звеньев фукозы, чтобы улучшить функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В других применениях можно ввести модификацию галактозилирования, чтобы модифицировать комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В некоторых вариантах реализации может потребоваться создать сконструированные с помощью цистеина антитела, например, «тиоМАТ», в которых один или более остатков антитела заменены на остатки цистеина.

В некоторых вариантах реализации антитело, предложенное в данной заявке, можно дополнительно модифицировать, чтобы оно содержало дополнительные небелковые молекулы, которые известны в данной области техники и легко

доступны. Указанные небелковые молекулы включают, но не ограничены водорастворимыми полимерами. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничены перечисленными: полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диалкан, поли-1,3,6-триалкан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры оксида полипропилена/оксида этилена, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Экспрессия антител.

В соответствии с настоящим изобретением предложены клетка-хозяин, содержащая один или более векторов экспрессии, и способ получения любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, очистку и выделение указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая любое из описанных выше антител против CD47 или их антигенсвязывающих фрагментов. Например, в соответствии с настоящим изобретением предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелые цепи, легкие цепи, переменные области или определяющие комплементарность участки, описанные в данной заявке. В некоторых аспектах, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи, идентична по меньшей мере на 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи, идентична по меньшей мере на 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 20.

В одном аспекте предложены один или более векторов, содержащих указанную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой вектор экспрессии. Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемой клетки-хозяина, в которой указанный вектор будут экспрессировать. Как правило, вектор экспрессии содержит промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с нуклеиновой кислотой, кодирующей цепь антитела против CD47 или ее антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии дополнительно содержит последовательность, кодирующую константную область антитела. В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии представляет собой вектор PTT5 или вектор pcDNA, такой как pcDNA3.4.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных антител в соответствии с настоящим изобретением, включая прокариотические или эукариотические клетки. В некоторых вариантах реализации *Escherichia coli* представляет собой прокариотического хозяина, которого можно применять для клонирования и экспрессии полинуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением. Другие подходящие микробные хозяева включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие *Enterobacteriaceae*, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получить векторы экспрессии, которые, как правило, содержат контролирующие экспрессию последовательности (например, точку начала репликации), которые совместимы с указанными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах реализации клетки-хозяева из млекопитающих используют для экспрессии и продукции полипептидов антитела против CD47 в соответствии с настоящим изобретением. Например, они могут представлять собой линии клеток гибридомы, экспрессирующие эндогенные гены иммуноглобулинов, или линии клеток млекопитающих с экзогенными векторами экспрессии, включая нормальные клетки человека, или иммортализованные клетки животного или человека. Например, было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактный иммуноглобулин, включая линии

клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки Expi293, клетки HEK293, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения антитела против CD47, причем указанный способ включает введение вектора экспрессии в клетку-хозяина из млекопитающего, и предоставление возможности экспрессии антитела в клетке-хозяине путем культивирования клетки-хозяина в течение достаточного периода времени, или, более предпочтительно, секрецию антитела в среду, в которой выращивают клетку-хозяина, для получения антитела. Для выделения антител из культуральной среды можно применять стандартные способы очистки белка. Молекулу антитела, полученную, как описано в данной заявке, можно очистить с помощью известных доступных методик, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, электрофорез в геле, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, и т.д. Фактические условия, используемые для очистки определенного белка, также зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и гидрофильность, которые понятны для специалиста в данной области техники. Чистоту молекулы антитела в соответствии с настоящим изобретением можно определить с помощью любого из различных хорошо известных аналитических способов, включая эксклюзионную хроматографию, электрофорез в геле, высокоэффективную жидкостную хроматографию, и т.д.

Антитела, экспрессированные различными линиями клеток или экспрессированные в трансгенных животных, вероятно, будут иметь отличное друг от друга гликозилирование. Тем не менее, все антитела, кодируемые нуклеиновыми кислотами, предложенными в данной заявке, или содержащие последовательности аминокислот, предложенные в данной заявке, входят в объем настоящего изобретения, независимо от гликозилирования указанных антител.

Способ определения.

Физические/химические свойства и/или биологические активности антитела против CD47, предложенного в данной заявке, можно определить, осуществить их скрининг или охарактеризовать с помощью различных способов определения, известных в данной области техники. В одном аспекте, исследовали активность

связывания антигена антителом в соответствии с настоящим изобретением, например, с помощью известного способа, такого как ELISA и вестерн-блоттинг. Способы, известные в данной области техники, можно применять для определения связывания с CD47, и примеры способов описаны в данной заявке.

5 В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ определения для идентификации антител против CD47 с биологическими активностями. Указанные биологические активности могут включать, например, связывание с CD47 (например, связывание с CD47 человека), связывание с CD47 на поверхности клетки, блокирование связывания CD47 с его лигандом, действия на
10 активность, стимулирующую агглютинацию эритроцитов, и действия на фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами человека, и т.д. Также предложены антитела, имеющие такие биологические активности *in vivo* и/или *in vitro*. В некоторых вариантах реализации антитела в соответствии с настоящим изобретением исследуют на такие биологические активности.

15 Клетки для применения в любом из приведенных выше способов определения *in vitro* включают линии клеток, которые в природе экспрессируют CD47 или сконструированы для экспрессии CD47, такие как линии опухолевых клеток. Такие клетки также включают линии клеток, которые экспрессируют CD47, и линии клеток, трансфицированные ДНК, кодирующей CD47, которая экспрессирует CD47
20 при нетипичных условиях.

Можно понять, что иммуноконъюгаты или иммунные слитые молекулы в соответствии с настоящим изобретением можно применять в качестве замены или дополнения к антителу против CD47 для осуществления любого из приведенных выше способов определения.

25 Можно понять, что комбинацию антитела против CD47 и других активных агентов можно применять для осуществления любого из приведенных выше способов определения.

Иммуноконъюгат и иммунная слитая молекула.

30 В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен иммуноконъюгат, содержащий любое антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в соответствии с настоящим

изобретением, и другие вещества. В одном варианте реализации другие вещества представляют собой, например, цитотоксический агент, который включает любой агент, который губителен для клеток.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложена иммунная слитая молекула, содержащая любое антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации иммуноконъюгат и иммунную слитую молекулу используют для предотвращения или лечения связанных с CD47 заболеваний.

10

Фармацевтическая композиция.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к такому препарату/составу, который позволяет активному ингредиенту, содержащемуся в нем, существовать в форме с эффективной биологической активностью, и не содержит дополнительных ингредиентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для субъекта, которому вводят указанный препарат/состав.

Термин «фармацевтическое вспомогательное вещество» относится к фармацевтическому носителю, разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному)) или вспомогательному веществу, которые вводят вместе с терапевтическим агентом.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать антитело в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтическое вспомогательное вещество. Эти фармацевтические композиции могут содержаться в наборах, таких как диагностические наборы.

В данной заявке «фармацевтический носитель» включает любой и все растворители, дисперсионную среду, изотонические агенты, замедляющие всасывание агенты, и т.д., которые физиологически совместимы. Фармацевтические носители, подходящие для настоящего изобретения, могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая таковые нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло, и т.д. Вода представляет собой предпочтительный носитель, когда фармацевтическую

25
30

композицию вводят внутривенно. Также возможно применение солевых растворов, водной декстрозы и растворов глицерина в качестве жидких носителей, особенно для инъектируемых растворов.

Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, диол, воду, этанол, и т.д. Применения вспомогательных веществ и их использование см. также в «Handbook of Pharmaceutical Excipients», пятое издание, R.C. Rowe, P.J. Seskey и S.C. Owen, Pharmaceutical Press, Лондон, Чикаго. Композиция также может содержать небольшое количество смачивающего агента или эмульгатора, или pH-буферного вещества. Эти композиции могут находиться в виде растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, агентов замедленного высвобождения, и т.д. Состав для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин фармацевтической степени чистоты, и т.д.

В соответствии с настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более моноклональных антител, связывающихся с CD47, или их антигенсвязывающих фрагментов, и нуклеиновые кислоты, векторы, или клетки-хозяева, или иммуноконъюгаты, или слитые молекулы в соответствии с настоящим изобретением. Должно быть понятно, что антитела против CD47, или антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор или его клетку-хозяина, или иммуноконъюгат, или слитую молекулу, или их фармацевтическую композицию, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, можно объединить с подходящими фармацевтическими носителями, вспомогательными веществами и другими реагентами в препарате для совместного введения, чтобы обеспечить улучшенный перенос, доставку, переносимость, и т.д.

Фармацевтический препарат/состав, содержащий антитело против CD47, описанное в данной заявке, можно получить путем смешивания антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, имеющих необходимую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтическими вспомогательными веществами, предпочтительно в виде водных растворов или лиофилизированных препаратов.

Типичные лиофилизированные препараты/составы антител описаны в патенте США № 6,267,958. Водные препараты/составы антител включают таковые, описанные в патенте США № 6,171,586 и WO 2006/044908, в последнем из них препарат/состав содержал гистидин-ацетатный буферный агент.

5 Фармацевтические композиции или препараты/составы в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать один или более других активных ингредиентов, которые необходимы для лечения конкретных заболеваний, предпочтительно активных ингредиентов с комплементарными активностями, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Например, 10 желательно, чтобы также были добавлены другие терапевтические агенты. В некоторых вариантах реализации указанные другие терапевтические агенты представляют собой химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, вакцины, другие антитела, иммуномодуляторы или другие биомакромолекулярные лекарственные средства.

15 В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением также может содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент.

20 Способы и применения.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предотвращения, диагностики или лечения связанных с CD47 заболеваний у субъекта. Указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, 25 описанных в данной заявке, или иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы, или фармацевтической композиции, содержащей их, или нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина, описанных в данной заявке.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение антител против CD47 или их антигенсвязывающих фрагментов для производства или 30 получения лекарственных средств для предотвращения, диагностики или лечения связанных с CD47 заболеваний у субъектов.

В одном аспекте, антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтические композиции, содержащие их, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, можно применять в качестве терапевтических агентов для предотвращения или лечения связанных с CD47 заболеваний у субъектов. При
5 связанных с CD47 заболеваниях у субъектов, обнаруженных с применением стандартных способов, можно вводить антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтические композиции, или иммуноконъюгаты, или иммунную слитую молекулу, содержащие их, раскрытые в настоящем изобретении, или нуклеиновые кислоты, векторы или клетки-хозяева,
10 описанные в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации способы и применения, описанные в данной заявке, дополнительно включают введение индивиду эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента или терапевтического метода. В некоторых вариантах реализации терапевтические
15 агенты представляют собой, например, химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, вакцины, другие антитела, иммуномодуляторы или другие биомакромолекулярные лекарственные средства. В некоторых вариантах реализации терапевтический метод включает хирургическое вмешательство; и лучевую терапию, местное облучение или облучение очага, и т.д.

20 Описанная выше комбинированная терапия включает комбинированное введение (при котором два или более терапевтических агентов содержатся в одном или в отдельных препаратах/составах) и отдельное введение, причем введение антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением может происходить до, одновременно или после
25 введения дополнительного терапевтического агента, и/или адъюванта, и/или лечения.

В некоторых вариантах реализации связанные с CD47 заболевания в соответствии с настоящим изобретением относятся к заболеваниям, связанным с аномальной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47 у субъекта,
30 включая, но не ограничиваясь раком. В некоторых вариантах реализации при связанных с CD47 заболеваниях нуклеиновая кислота, кодирующая CD47 (ее уровень или содержание), повышена, или экспрессия CD47 повышена, или уровень

белка CD47 повышен, или активность повышена, или активность передачи сигнала повышена.

В некоторых вариантах реализации при лечении заболевания будет польза от ингибирования CD47 на уровнях нуклеиновой кислоты или белка, или польза от
5 блокирования связывания CD47 с его лигандом или опосредованной CD47 передачи сигнала.

В некоторых вариантах реализации субъект может представлять собой млекопитающее, например, примата, предпочтительно высшего примата, например, человека (например, индивида, страдающего от заболевания, описанного в данной
10 заявке, или имеющего риск пострадать от заболевания, описанного в данной заявке). В одном варианте реализации субъект страдает или имеет риск пострадать от заболевания, описанного в данной заявке (например, рака). В некоторых вариантах реализации субъект получает или получил другое лечение, такое как химиотерапия и/или лучевая терапия.

В некоторых вариантах реализации рак включает различные гематологические
15 виды рака и солидные опухоли, и метастатические очаги. В одном варианте реализации примеры солидных опухолей включают злокачественные опухоли. Указанный рак может быть на ранней стадии, на средней стадии или на поздней стадии, или может представлять собой метастатический рак. Рак, например,
20 представляет собой рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, лимфомы, лейкоз, множественную миелому, (злокачественную) меланому, лейомиому, лейомиосаркомы, глиому, глиобластому, миелому, рак эндометрия, карциному почки, (доброкачественную) меланому, рак предстательной железы, карциному щитовидной железы, рак шейки матки, рак желудка или рак печени. В некоторых
25 вариантах реализации лимфома выбрана из лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной лимфомы или лимфомы из клеток мантийной зоны. В некоторых вариантах реализации лейкоз представляет собой промиелоцитарный лейкоз.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением можно вводить любым подходящим способом, включая пероральное,
30 парентеральное, внутривенное и интраназальное введение, и, если необходимо топическое лечение, его можно вводить внутрь очага. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, интраартериальное,

интраперитонеальное или подкожное введение. Введение можно осуществить с помощью любого подходящего пути, например, с помощью инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, отчасти, в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В данной заявке предложены различные схемы введения, включая, но не ограничиваясь перечисленными: разовое или многократные введения в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением будут входить в состав и вводиться способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Не обязательно, но возможно, антитело входит в состав с одним или более агентами, которые на сегодняшний день применяют для предотвращения или лечения заболевания. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в препарате/составе, типа состояния или заболевания, от которого лечат, и других факторов, которые обсуждались выше. Для того чтобы предотвратить или лечить заболевания, антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением будут вводить в подходящей дозе в зависимости от типа заболевания, от которого лечат, типа антител, тяжести и течения заболевания, от того, дают ли антитело с целью предотвращения или лечения, от предшествующего лечения, истории болезни пациента и ответа на антитела, и от решения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или серией введений.

В некоторых вариантах реализации любое антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в данной заявке, можно применять для детектирования присутствия CD47 в образце. В некоторых вариантах реализации способ детектирования включает:

(a) приведение в контакт образца с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или их конъюгатом или слитой молекулой в соответствии с настоящим изобретением; и

(b) детектирование образования комплекса антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата, или слитой молекулы и белка CD47.

Термин «детектирование», когда его используют в данной заявке, включает количественное или качественное детектирование. В некоторых вариантах реализации образец представляет собой кровь, сыворотку или другие жидкие образцы биологического происхождения. В некоторых вариантах реализации
5 образец содержит клетки или ткани. В некоторых вариантах реализации образец получен из гиперпролиферативного или ракового очага.

В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением можно применять для диагностики связанных с CD47 заболеваний, таких как рак, например, для оценки
10 (например, отслеживания) лечения или прогрессирования заболеваний, описанных в данной заявке, и их диагностики и/или стадирования у индивида. В некоторых вариантах реализации предложено меченое антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент. Метки включают, но не ограничены метками или частями, которые детектируют напрямую (такими как флуоресцентные метки,
15 хромофорные метки, электроноплотные метки, хемилуминесцентные метки и радиоактивные метки), и частями, которые детектируют опосредованно, такими как ферменты или лиганды, например, путем ферментативных реакций или межмолекулярных взаимодействий. В некоторых вариантах реализации в настоящей заявке предложен набор для диагностики связанных с CD47
20 заболеваний, указанный набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах реализации, предложенных в данной заявке, образец получают до лечения антителом против CD47 или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации образец получают до лечения
25 другими методами лечения. В некоторых вариантах реализации образец получают во время или после лечения другими методами лечения.

Настоящее изобретение включает любые комбинации конкретных вариантов реализации, описанных в данной заявке. Должно быть понятно, что хотя конкретное содержание и примеры описаны для иллюстрирования
30 предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения, они лишь иллюстрирующие и используются в качестве примеров. В объем настоящего изобретения дополнительно входят измененные варианты реализации на основе

предпочтительных вариантов реализации в соответствии с настоящим изобретением, которые понятны для специалиста в данной области техники. Во всех отношениях, все публикации, патенты и заявки на патент, цитированные в данной заявке, включая приведенные в них ссылки, полностью включены в данную
5 заявку посредством ссылки.

Подробное описание вариантов реализации.

Пример 1. Получение и скрининг происходящего из гибридомы антитела.

Антитела против CD47 получали с помощью гибридомной технологии.
10 Рекомбинантный белок CD47-Fc (ACROBiosystems, номер в каталоге CD7-H5256), содержащий внеклеточный домен CD47 человека с Fc-меткой использовали в качестве антигена для иммунизации мышей. После смешивания и эмульгирования рекомбинантного белка CD47-Fc с полным или неполным адъювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich), иммунизировали мышей SJL (Beijing Vital River Laboratory Animal
15 Technology Co., Ltd) и мышей BALB/c (Yangzhou University Medical Center). Проводили один раунд иммунизации (полный адъювант Фрейнда) и два раунда бустер-иммунизации (неполный адъювант Фрейнда) мышей и брали кровь после каждой бустер-иммунизации. Активность связывания сыворотки мышей после иммунизации с рекомбинантным белком CD47 человека-Fc (ACROBiosystems,
20 номер в каталоге CD7-H5256) детектировали с помощью анализа ELISA, и, в то же время, эффективность связывания сыворотки мышей с клетками CHO с повышенной экспрессией CD47 человека (сконструированными в GenScript) детектировали с помощью проточной цитометрии (FACS). Клетки селезенки мышей с более высоким титром в сыворотке выбирали для слияния с линией
25 клеток миеломы SP2/0 (ATCC). За четыре дня до слияния, рекомбинантный белок CD47-Fc внеклеточного домена CD47 человека вводили путем интраперитонеальной инъекции мышам для бустер-иммунизации. В день слияния осуществляли умерщвление мышей, а затем клетки селезенки мышей гомогенизировали с получением суспензии отдельных клеток. Клетки селезенки
30 мышей сливали с линией клеток миеломы мыши SP2/0 (3:1) посредством устройства для электрослияния. Слитые клетки ресуспендировали в среде, содержащей НАТ (гипоксантин, аминоптерин и дезоксинуклеотид тимидин,

GIBCO, номер в каталоге 21060016), чтобы провести скрининг успешно слитых клеток гибридомы. Собирали супернатант клеток гибридомы, и проводили скрининг клеток гибридомы, которые секретируют антитела, специфично связывающиеся с CD47 человека, с помощью двух раундов ELISA. Затем, 5 активность секреции гибридомой в супернатант определяли с помощью тестов функционального скрининга, относящихся к CD47 (например, на специфичность связывания с CD47 человека или CD47 яванского макака; отсутствие активности индукции агглютинации эритроцитов; активность стимуляции фагоцитоза опухолевых клеток макрофагами), а затем выбирали положительные клоны 10 гибридомы и субклонировали в одном или множестве раундов с получением моноклона. После скрининга, 125G4A4, наконец, был выбран в качестве клона гибридомы.

Проводили культивирование с целью размножения кандидатной клетки гибридомы 125G4A4, и после 7 - 10 дней культивирования, супернатант собирали, 15 центрифугировали и фильтровали для удаления клеток и обломков. Супернатанты пропускали через очищающую колонку с белком А (GenScript), затем осветляли и уравнивали буфером, содержащим 0,05 М Трис и 1,5 М NaCl (pH 8,0), а затем элюировали 0,1 М цитратом натрия (pH 3,5); и элюент незамедлительно нейтрализовали одной девятой объема 1 М Трис-HCl (pH 9), а затем проводили 20 диализ против буфера ФБР. Наконец, происходящее из гибридомы антитело 125G4A4 было получено для дальнейшего исследования.

1.1 Детектирование активности связывания антител с клетками CHO-K1 с повышенной экспрессией белков CD47 человека с помощью FACS.

25 Белок CD47 человека (номер доступа в NCBI: NP_001768.1) сверхэкспрессировали в линии клеток яичника хомяка CHO-K1, чтобы создать линию клеток CHO-K1 с повышенной экспрессией белка CD47 человека. Клетки совместно инкубировали с серийным разведением антитела 125G4A4 и контрольного антитела C0774CK230-C (т.е., Hu5F9) (наиболее высокая 30 концентрация составляла 300 нМ, трехкратное разведение, всего 12 точек концентрации) при 4°C в течение 50 минут. После двухкратной промывки охлажденным до температуры льда ФБР, клетки инкубировали с меченым

iFluor647 антителом козы против IgG (H + L) мыши (Genscript) при 4°C в темноте в течение 40 минут. Клетки промывали дважды охлажденным до температуры льда ФБР, а затем детектировали флуоресцентный сигнал с помощью проточной цитометрии на Calibur (BD Biosciences), и в соответствии со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) сигнала, использовали GraphPad для аппроксимации кривой зависимости от концентрации, и рассчитывали EC₅₀. В Таблице 1 показано, что полученное в результате этого происходящее из гибридомы антитело 125G4A4 обладало высокой активностью связывания с CHO-K1 с повышенной экспрессией белка CD47 человека, с EC₅₀, равной 0,22 нМ.

10

1.2 Детектирование активности связывания антител с CD47 на поверхности опухолевых клеток с помощью FACS.

CD47 человека эндогенно экспрессировался на поверхности клеток Raji линии клеток лимфомы Беркитта человека. Готовили серийные разведения антитела 125G4A4 и контрольного антитела Hu5F9 в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС, Gibco, номер в каталоге 10100147) (наибольшая концентрация составляла 46,3 нМ, трехкратное разведение, всего 8 точек концентрации). Разбавленные антитела смешивали и совместно инкубировали с клетками Raji (приобретали у ATCC) ($5 \cdot 10^5$ клеток/лунку) при 4°C в течение 1 часа. После трехкратной промывки в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС), добавляли меченое PE антитело мыши против IgG Fc человека (Biolegend, номер в каталоге 409304) и инкубировали с указанными клетками при 4°C в темноте в течение 1 часа. Клетки промывали три раза ФБР, содержащим 2% эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС), а затем детектировали флуоресцентный сигнал с помощью проточной цитометрии на CantoII (BD Biosciences), и в соответствии со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) сигнала, использовали GraphPad для аппроксимации кривой зависимости от концентрации, и рассчитывали EC₅₀. В Таблице 1 показано, что происходящее из гибридомы антитело 125G4A4 имеет активность связывания с клетками Raji с EC₅₀, составляющей $0,84 \pm 0,02$ нМ.

30

1.3 Блокирование взаимодействия между CD47 и SIRP α человека с помощью антител против CD47.

Анализ ELISA проводили для детектирования способности 125G4A4 блокировать взаимодействие между CD47 и SIRP α человека. Рекомбинантным белком hCD47-Fc, содержащим внеклеточный домен CD47 человека, слитый с фрагментом Fc IgG человека (ACROBiosystems, номер в каталоге CD7-H5256), покрывали 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшет промывали три раза ФБРТ (ФБР, содержащим 0,5% твин-20), добавляли ФБРТ, содержащий 1% БСА, для блокирования планшета в течение 2 часов. После трехкратной промывки планшета ФБРТ, добавляли смесь приготовленных серийных разведений антитела 125G4A4 или контрольного антитела Hu5F9 (наибольшая концентрация составляла 66,7 нМ, трехкратное разведение, всего 8 точек концентрации) вместе с рекомбинантным белком SIRP α -His (ACROBiosystems, номер в каталоге SIA-5225) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшет промывали три раза ФБРТ, и добавляли меченое пероксидазой хрена вторичное антитело козы против метки His (CWBIO, номер в каталоге CW0285M) для детектирования SIRP α , захваченного белком CD47, которым был покрыт планшет. После инкубирования 96-луночного планшета при 37°C в течение 30 минут, планшет промывали 5 раз ФБРТ и добавляли проявляющий раствор TMD (Surmodics, номер в каталоге TMBW-1000-01), и инкубировали в темноте в течение 15 минут. Добавляли 2N H₂SO₄, чтобы остановить реакцию проявления цвета. ОП₄₅₀ считывали на спектрофотометре для прочтения микропланшетов. Значение поглощения отражало количество SIRP α , который связался с CD47. Использовали GraphPad для аппроксимации кривой зависимости от концентрации, и рассчитывали IC₅₀ антитела против CD47 для блокирования связывания CD47 с SIRP α . В Таблице 1 показано, что 125G4A4 может эффективно блокировать взаимодействие CD47/SIRP α с IC₅₀, составляющей 3,06 нМ.

1.4 Детектирование активности индукции агглютинации эритроцитов человека антителами против CD47.

Из известного уровня техники известно, что большинство антител против CD47 обладают свойством вызывать агглютинацию эритроцитов. Широко распространено мнение, что указанное свойство тесно связано с клиническими побочными действиями, такими как анемия, возникающими при лечении терапевтическим антителом против CD47. Следовательно, авторы настоящего изобретения оценили антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением с помощью эксперимента по агглютинации эритроцитов *in vitro*, чтобы выявить антитело без свойства вызывать агглютинацию эритроцитов. Способ описан далее: сбор свежей крови человека из здоровых доноров, промывка клеток ФБР пять раз, а затем разбавление клеток с получением суспензии, содержащей 10% эритроцитов человека; смешивание суспензии эритроцитов с экспериментальным антителом (антителом 125G4A4 и контрольным антителом Hu5F9, наибольшая концентрация составляла 667 нМ, трехкратное разведение, всего 12 точек концентрации), затем добавление смеси в круглодонный 96-луночный планшет; и инкубация при комнатной температуре в течение 16 часов, затем получение фотографий и определение результатов в соответствии с видом клеток в лунке. Если агглютинация эритроцитов происходила, то клетки располагались в каждой лунке подобно сетке, и в лунке появлялся выглядящий как пласт слой клеток большего диаметра, чем таковой в лунке отрицательного контроля; напротив, если гемагглютинация не происходила, эритроциты оседали на дно лунки, и в лунке наблюдалась меньшая выглядящая как точка преципитация осадка клеток. Для 125G4A4 не выявили очевидного вида стимуляции агглютинации эритроцитов в этом эксперименте.

1.5 Определение профагоцитарного действия антител против CD47 на опухолевые клетки посредством макрофагов человека.

Способность антитела 125G4A4 в соответствии с настоящим изобретением вызывать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами детектировали с помощью анализа, основанного на проточной цитометрии. Свежую кровь человека собирали из здоровых доноров, и моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, номер в каталоге 17-1440-02). Затем выделяли и получали

моноциты, применяя набор для выделения общей популяции моноцитов человека (Miltenyi biotec, номер в каталоге 130-096-537). Для индукции дифференцировки моноцитов в макрофаги добавляли колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF, R & D Systems, номер в каталоге 216-MC), и вели адгерентную культуру моноцитов в течение 7 последующих дней. В день эксперимента по фагоцитозу клеток, описанные выше дифференцированные макрофаги помещали в условия голодания в бессывороточную среду на 2 часа. В то же время, целевые опухолевые клетки Raji метили флуоресцентной меткой CFSE (eBioscience, номер в каталоге 65-0850-85) в соответствии с этапами, рекомендованными в инструкции. Меченые CFSE опухолевые клетки и макрофаги смешивали при соотношении 4:1, и добавляли экспериментальные антитела в детектируемой концентрации, и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Затем клетки промывали дважды ФБР, а затем гидролизовали трипсином (Gibco, номер в каталоге 25200072); добавляли меченое APC антитело против CD14 (Biolegend, номер в каталоге 325608) и инкубировали в темноте на льду в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку, в течение 30 минут. Клетки промывали дважды и анализировали с помощью проточной цитометрии. Рассчитывали процент положительных по CFSE клеток в популяциях положительных по CD14 макрофагов. В Таблице 1 показано, что 125G4A4 может эффективно вызывать фагоцитарную функцию макрофагов в отношении опухолевых клеток.

Таблица 1. Определение активности и функции происходящего из гибридомы антитела 125G4A4.

Идентификационный номер клона	Связывание с клетками CHO-K1 с повышенной экспрессией белка CD47 человека (FACS, EC ₅₀ , нМ)	Связывание с CD47 на поверхности клеток Raji (FACS, EC ₅₀ , нМ) (n = 3)	Блокирование связывания SIRPα с белком CD47 человека (ELISA, IC ₅₀ , нМ)	Анализ агглютинации эритроцитов (0,03 – 66,7 нМ)	% уровня фагоцитоза Raji (концентрация антитела: 33 нМ)
Hu5F9	0,37	0,3 ± 0,01	1,55	Положительно (7,4 - 66,6 нМ)	36,5%
125G4A4	0,22	0,84 ± 0,02	3,06	Отрицательно	71,7%

Пример 2. Гуманизирование происходящего из гибридомы антитела.

2.1 Определение последовательности вариабельной области происходящего из гибридомы антитела.

В соответствии со способом секвенирования гибридомы, проводили
5 культивирование клеток клона 125G4A4 гибридомы с целью размножения; общую
РНК выделяли с помощью тризола (TRIzol, приобретали у Ambio) и осуществляли
обратную транскрипцию с получением ДНК с помощью специфичных для
антитела праймеров (Takara, PrimerScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit); и
осуществляли амплификацию фрагмента гена, кодирующего область V
10 иммуноглобулина мыши, с помощью специфичных к антителу праймеров.
Получали последовательность вариабельной области происходящего из гибридомы
антитела путем анализа секвенирования. Последовательности аминокислот
вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела
125G4A4 были такими, как представленные в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, и
15 последовательности нуклеотидов были такими, как представленные в SEQ ID NO:
19 и 20, соответственно.

2.2 Конструирование и экспрессия химерных антител.

В соответствии с механизмом действия CD47, в конкретном варианте
20 реализации настоящего изобретения, константную область IgG4 человека (S228P)
использовали в качестве константной области тяжелой цепи антитела, и
константную область легкой цепи человека использовали в качестве константной
области легкой цепи антитела. Мутация серина в положении 228 шарнирной
области кора IgG4 на пролин (S228P) может увеличить количество дисульфидных
25 связей в шарнирной области кора и снизить обмен плеча Fab IgG4, и, тем самым,
сильно уменьшить образование половин молекул. После синтеза генов,
кодирующих константные области тяжелой цепи и легкой цепи, гены вариабельной
области тяжелой цепи и легкой цепи гомологично рекомбинировали в вектор РТТ5
с помощью расщепления двумя ферментами EcoRI и BamHI. После подтверждения
30 последовательностей секвенированием, тяжелой цепью и легкой цепью антитела
при молярном соотношении 1,5:1 котрансфицировали клетки НЕК293. После 120

часов культивирования, супернатант собирали путем центрифугирования и очищали с получением химерного антитела.

Перед дизайном гуманизирования, необходимо мутировать некоторые сайты посттрансляционных модификаций (ПТМ) в участке CDR, чтобы избежать влияния на конформацию белка, что повлияет на его функцию. Согласно анализу ПТМ, обнаружили два сайта ПТМ в CDR 125G4A4, включая один сайт гликозилирования **NSS** в тяжелой цепи и один сайт изомеризации **DG** в легкой цепи. Сайт гликозилирования NSS и сайт изомеризации DG мутировали с получением QSS и EG, соответственно. Мутированное химерное антитело, полученное путем очистки в данном примере, назвали Ch-125G4-m35. Последовательности аминокислот переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела Ch-125G4-m35 такие, как представленные в SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно.

2.3 Гуманизированный дизайн химерных антител.

Для того чтобы выбрать каркасную последовательность антитела человека с наибольшим подобием химерному антителу 125G4A4m для гуманизирования, последовательность переменной области химерного антитела 125G4A4m выравнивали с помощью BLAST, используя базу данных PDB Antibody. Переменная область тяжелой цепи 125G4A4m имела большую гомологию последовательности с зародышевым IGHV1-69 человека, и переменная область его легкой цепи имела большую гомологию последовательности с зародышевым IGKV1-16 человека. Затем последовательность аминокислот CDR переменной области и его точную границу определяли с помощью системы нумерации по Кабату. Затем, фрагменты CDR переменной области антитела мыши прививали на каркасную последовательность человека с получением гуманизированного антитела.

Для поддержания активности гуманизированного антитела, каркасные последовательности аминокислот переменной области и окружающей ее области анализировали с помощью анализа методом макромолекулярного докинга, применяя технологию компьютерного моделирования, чтобы исследовать их пространственный стереоскопический вид связывания. Путем вычисления электростатической силы, силы Ван-дер-Ваальса, гидрофильности и энтропии,

анализировали отдельные ключевые аминокислоты, которые могут взаимодействовать с CD47 и сохранять пространственный каркас, в последовательности генов кандидатного антитела, и прививали их обратно на ген выбранного каркаса антитела человека. При этом отмечали положения

5 аминокислот в каркасной области, которые нужно сохранить. На основании указанного выше процесса синтезировали гуманизированное антитело. Некоторые ключевые сайты в каркасной области антитела мутировали обратно в соответствии с последовательностью каркасной области химерного антитела Ch-125G4-m35. В соответствии с количеством и расположением обратных мутаций, разработали

10 множество различных гуманизированных переменных областей тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7) и переменных областей легкой цепи (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10), соответственно (см. Таблицу 2). Окончательно определенное гуманизированное антитело Hu-125G4A4-48 в соответствии с настоящим изобретением далее называют HMA02h14-48.

15 Последовательности аминокислот переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела такие, как представленные в SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно.

Таблица 2. Количество и расположение обратных мутаций в тяжелой цепи и легкой цепи 125G4A4m.

Номер последовательности	Номер мутации	Сайт мутации
Переменная область тяжелой цепи		
SEQ ID NO: 5	3	E73K, S76R, S82aT
SEQ ID NO: 6	4	E73K, S76R, A78T, S82aT
SEQ ID NO: 7	6	V67A, I69L, E73K, S76R, A78T, S82aT
Переменная область легкой цепи		
SEQ ID NO: 8	1	F71Y
SEQ ID NO: 9	2	T69Q, F71Y
SEQ ID NO: 10	6	Q3K, S46T, S60L, T69Q, F71Y, Y87F

20

Таблица 3. Последовательность аминокислот антитела против CD47

Антитело	Последовательность переменной	Последовательность переменной области
----------	-------------------------------	---------------------------------------

	области тяжелой цепи	легкой цепи
125G4A4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
ch-125G4-m35	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Hu-125G4A4m-43	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9
Hu-125G4A4m-44	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10
Hu-125G4A4m-45	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 8
Hu-125G4A4m-46	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 9
Hu-125G4A4m-47	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 10
Hu-125G4A4m-48	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
Hu-125G4A4m-49	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9
Hu-125G4A4m-50	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10

**Таблица 4. Последовательности аминокислот CDR антител против CD47
(определение по Кабату)**

CDR	125G4A4	ch-125G4-m35	HMA02h14-48 и его варианты
HCDR1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 11
HCDR2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 12
HCDR3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 17
LCDR1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 14
LCDR2	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 18
LCDR3	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 16

5 2.4 Экспрессия гуманизированных антител.

Фрагменты ДНК, кодирующие указанные выше разработанные гуманизированные переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, амплифицировали и клонировали в вектор, содержащий константную область для экспрессии антитела человека, чтобы сконструировать экспрессирующую антитело плазмиду (pcDNA3.4, приобретали у Thermo, номер в каталоге A14697). Векторами экспрессии тяжелой и легкой цепи котрансфицировали клетки Expi293 (Thermo, номер в каталоге A14525). После культивирования при 37°C в течение 6 дней, собирали супернатант. В соответствии с приведенным выше способом, получали рекомбинантное антитело с помощью аффинной очистки на белке А для дальнейшего исследования антитела. Указанное гуманизированное антитело принадлежало подтипу IgG4 S228P (IgG4P).

Пример 3. Скрининг гуманизированных антител.

Высокоактивные гуманизированные антитела подвергали скринингу путем детектирования способности связывания гуманизированного антитела с В-клетками яванского макака, способности макрофагов человека фагоцитировать опухолевые клетки и способности вызывать агглютинацию эритроцитов.

Детектирование способности связывания гуманизированного антитела с В-клетками яванского макака: способ проточной цитометрии применяли для детектирования связывания ряда гуманизированных антител 125G4A4 с CD47 на поверхности В-клеток яванского макака. Способ описан далее: мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из крови яванских макаков (предоставленной Shanghai Yinuosi Bio-Technology Co., Ltd.) путем центрифугирования в градиенте плотности фикола Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, номер в каталоге 17-1440-02). МКПК инкубировали с рядом гуманизированных антител 125G4A4 или изотипических контролей (IgG4P) в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку, при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали три раза и инкубировали с вторичным антителом (меченым PE антителом мыши против Fc IgG человека, Biolegend, номер в каталоге 409304) в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку, при 4°C в темноте в течение 30 минут. Клетки промывали три раза и анализировали с помощью проточной цитометрии. В-клетки метили антителом против CD20 человека (меченым Brilliant Violet 421™ антителом против CD20 человека, Biolegend, номер в каталоге 302330), обладающим перекрестной реактивностью с яванским макаком, и детектировали с помощью проточной цитометрии на Canto II (BD Biosciences) с получением средней интенсивности флуоресценции (MFI).

В соответствии со способами, описанными в Примерах 1.5 и 1.4, детектировали способность макрофагов фагоцитировать опухолевые клетки и способность вызывать агглютинацию эритроцитов, соответственно.

В Таблице 5 показано, что ряд гуманизированных антител 125G4A4 связывались с CD47, экспрессированным на В-клетках яванского макака, при исследованных концентрациях. Указанные антитела вызвали фагоцитоз опухолевых клеток Raji макрофагами, из которых у Hu-125G4A4m-48 выявили наибольшую фагоцитарную эффективность при 33 нМ. Другие активности Hu-

125G4A4m-48 были аналогичны таковым у химерного антитела Ch-125G4m-m35. Более того, количество обратных мутаций было меньше. Следовательно, Hu-125G4A4m-48 выбрали для дальнейшего анализа и далее называли HMA02h14-48.

Таблица 5. Анализ активности *in vitro* ряда гуманизированных антител против CD47.

5

Антитело	Количество обратных мутаций	Детектирование эффективности связывания с В-клетками яванского макака с помощью FACS		% уровня фагоцитоза Raji		Агглютинация эритроцитов
		Макс MFI, тестируемая концентрация антитела 66,7 нМ	По сравнению со значением Ch-125G4m-m35, %	Тестируемая концентрация антитела 33 нМ	По сравнению со значением Ch-125G4m-m35, %	
Hu5F9	-	4118	90	18,3		Положительно
Ch-125G4m-m35	-	4551	100	30,2	100	Отрицательно
Hu-125G4A4m-43	6	3259	72	33,8	112	Отрицательно
Hu-125G4A4m-44	10	4512	99	33,3	110	Отрицательно
Hu-125G4A4m-45	4	2634	58	28,8	95	Отрицательно
Hu-125G4A4m-46	5	2522	55	31,4	104	Отрицательно
Hu-125G4A4m-47	9	4100	90	32,1	106	Отрицательно
Hu-125G4A4m-48	7	4195	92	35,6	118	Отрицательно
Hu-125G4A4m-49	8	4079	90	35,1	116	Отрицательно
Hu-	12	4839	106	34,5	114	Отрицательно

125G4A4m						о
-50						
изотип	-	53	-	4,2	-	Отрицательн о

Пример 4. Определение активности связывания НМА02h14-48 с опухолевыми клетками с помощью FACS.

CD47 человека эндогенно экспрессируется на поверхности клеток Raji - линии
 5 клеток лимфомы Беркитта человека (Shanghai Institutes for Biological Sciences, SIBS, CCL-86™/ATCC), клеток Toledo диффузной крупноклеточной лимфомы человека (ATCC® CRL-2631™) и клеток REC-1 лимфомы из клеток мантийной зоны человека (ATCC® CRL-3004™). В соответствии со способом детектирования, описанным в предшествующем Примере 1.2, проточную цитометрию применяли
 10 для детектирования связывания гуманизированного антитела НМА02h14-48 с CD47 на поверхности указанных выше линий опухолевых клеток. Наибольшая концентрация антитела составляла 667 нМ, готовили серийные разведения антител, и исследовали всего 8 точек концентрации.

На Фигурах 1 - 3 показано, что оба НМА02h14-48 и Hu5F9 связывались с
 15 CD47 на поверхности опухолевых клеток, включая Raji, Toledo и REC-1. Максимальная интенсивность флуоресценции, когда НМА02h14-48 достигало плато, выше, чем таковая у Hu5F9, и EC₅₀ и максимальная интенсивность флуоресценции показаны в Таблице 6.

Таблица 6. Активность связывания антитела НМА02h14-48 с CD47 на поверхности
 20 опухолевых клеток.

		Изотип	НМА02h14-48	Hu5F9
Raji	EC ₅₀ (нМ)	/	1,2	0,75
	Макс MFI	175	7436	5958
Toledo	EC ₅₀ (нМ)	/	2,2	1,4
	Макс MFI	50	6873	6703
REC-1	EC ₅₀ (нМ)	/	0,6	0,3
	Макс MFI	265	12629	10805

Антитело отрицательного изотипического контроля (изотип), которое использовали в данном примере и других примерах, представляло собой IgG4P человека, которое приобретали у Shanghai Chempartner Co., Ltd.

Пример 5. Определение аффинности связывания антитела НМА02h14-48 с CD47 человека с помощью Biacore.

Вiacore применяли, чтобы определить параметры кинетики связывания путем измерения поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Эту технологию применяли для детектирования микроскопических констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) антитела и антигена. На основании значений k_a и k_d , можно получить значение аффинности антитела и антигена. Как устройство Biacore (Biacore T200), так и реагенты приобретали у GE Healthcare. Антитело против Fc человека иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Очищенные антитела (НМА02Н14-48 и Hu5F9) разбавляли в буфере подвижной фазы (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% твин-20, pH 7,4), и пропускали через чип CM5, покрытый антителами против Fc человека. Затем полученные серийные разведения слитого белка CD47 человека-His (ACROBiosystems, номер в каталоге CD7-H5227) пропускали через детектирующий чип, чтобы измерить связывание антигена и антитела, а затем буфер подвижной фазы пропускали через чип для детектирования диссоциации антигена от антитела. Собирали данные сигналов ассоциации и диссоциации антигена и антитела при различных концентрациях и аппроксимировали при 1:1 с помощью модели Ленгмюра, чтобы рассчитать аффинность антигена и антитела.

В Таблице 7 показано, что НМА02h14-48 связывается с CD47 человека с высокой аффинностью со значением K_D 7,77E-10 (М).

Таблица 7. Определение кинетических констант связывания гуманизированного антитела с CD47 человека с помощью Biacore.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
НМА02h14-48	8,34E+05	6,48E-03	7,77E-10
Hu5F9	5,2E+07	1,01E-01	2,01E-09

Пример 6. Детектирование активности НМА02h14-48 в отношении блокирования взаимодействия между CD47 и SIRPα человека с помощью ELISA.

В соответствии со способом, описанным в предшествующем Примере 1.3, ELISA применяли для детектирования способности НМА02h14-48 блокировать взаимодействие между CD47 и SIRP α человека. Наибольшая концентрация антитела составляла 67 нМ, готовили серийные разведения антител и исследовали

5 всего 8 точек концентрации.

На Фигуре 4 показано, что антитело НМА02h14-48 в соответствии с настоящим изобретением блокирует взаимодействие между CD47 и SIRP α человека с $IC_{50} = 1,58$ нМ.

10 **Пример 7. Действие НМА02h14-48 на фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами человека.**

В соответствии со способом, описанным в Примере 1.5, детектировали действие НМА02h14-48 на стимуляцию фагоцитоза макрофагами человека клеток Raji линии клеток лимфомы Беркитта человека, клеток Toledo диффузной

15 крупноклеточной лимфомы человека, клеток REC-1 лимфомы из клеток мантийной зоны человека и клеток HL-60 линии клеток промиелоцитарного лейкоза человека. Наибольшая концентрация антитела составляла 100 мкг/мл, готовили серийные разведения антител и исследовали всего 8 точек концентрации.

Результаты показали, что по сравнению с контрольными антителами Hu5F9 и

20 SRF231, НМА02h14-48 могло эффективно вызывать фагоцитоз макрофагами линии клеток Raji лимфомы Беркитта человека. Наибольшая эффективность фагоцитоза составляла до 36,5%, и уровни фагоцитоза при различных концентрациях от 0,1 до 100 мкг/мл были выше, чем таковые для Hu5F9 и SRF231. Наибольшая эффективность фагоцитоза для НМА02h14-48 в отношении клеток REC-1 лимфомы

25 из клеток мантийной зоны человека составляла до 84,6%, и фагоцитоз мог поддерживаться приблизительно на уровне 70% даже при низкой концентрации 0,1 мкг/мл, и был выше, чем таковой для Hu5F9 и SRF231. НМА02h14-48 вызывало фагоцитоз клеток Toledo макрофагами, и уровень фагоцитоза составлял до 94,2%. НМА02h14-48 могло вызывать фагоцитоз опухолевых клеток HL-60 макрофагами,

30 и наибольшая эффективность фагоцитоза составляла до 65%.

Таблица 8. Действие антитела НМА02h14-48 в отношении стимуляции фагоцитоза опухолевых клеток посредством МФ человека.

	Уровень фагоцитоза (%)		
	HMA02h14-48	Hu5F9	SRF231
Toledo			
100	94,0	92,5	/
10	94,2	91,8	
1	93,8	92,2	
0,1	73,9	74,2	
0,01 мкг/мл	43,5	54,8	
изотип (100 мкг/мл)	11,3	11,3	
Raji			
100	31,9	15,5	22,9
10,	36,5	16,4	26,8
1,	35,8	14,8	25,6
0,1	21,3	9,0	9,0
0,01 мкг/мл	5,7	4,7	2,2
изотип (100 мкг/мл)	2,4	2,4	2,4
REC-1			
100	84,6	74,6	87,4
10	84,1	72,7	85,8
1	83,7	67,3	84,2
0,1	70,0	33,0	45,9
0,01 мкг/мл	19,2	19,6	19,6
изотип (100 мкг/мл)	8,5	8,5	8,5
HL-60			
100	65,0	66,3	/
10	67,6	69,3	
1	67,1	73	
0,01 мкг/мл	50,4	53,9	
изотип (100 мкг/мл)	45,7	45,7	

Пример 8. Детектирование действия HMA02h14-48 на индукцию агглютинации эритроцитов *in vitro*.

Эритроциты человека разбавляли до 10% в ФБР и инкубировали с антителом
5 против CD47, добавленным в круглодонный 96-луночный планшет, в течение 16 часов при комнатной температуре. Присутствие непреципитированных эритроцитов являлось признаком, который доказывал агглютинацию эритроцитов. По сравнению с белыми точками, образующимися при преципитации неагглютиниравших эритроцитов, непреципитированные эритроциты могли

образовывать сетчатую зону, которая была больше, чем таковая для антитела отрицательного изотипического контроля (см. Фигуру 9). Результаты для антитела отрицательного изотипического контроля (Изотип) использовали в качестве нормальных стандартов.

5 В соответствии со способом, описанным в Примере 1.4, исследовали антитело НМА0214-48, чтобы посмотреть, вызывает ли оно агглютинацию эритроцитов. Наибольшая концентрация антитела составляла 667 нМ, готовили серийные разведения антител и исследовали всего 12 точек концентрации.

10 На Фигуре 9 показано, что антитело против CD47 Hu5F9 могло вызывать значительную агглютинацию эритроцитов, когда его концентрация составляла 0,9 нМ или выше. Напротив, антитело НМА02h14-48 в соответствии с настоящим изобретением не вызывало значительной гемагглютинации эритроцитов человека *in vitro* при различных концентрациях от 0,004 до 667 нМ.

15 **Пример 9. Детектирование активности связывания НМА02h14-48 с эритроцитами человека с помощью FACS.**

Из известного уровня техники ясно, что когда терапевтические антитела против CD47 применяют в клинических условиях, часто происходят побочные действия, такие как анемия. Обычно считают, что антитела против CD47
20 связываются с CD47 на поверхности эритроцитов, что будет, в свою очередь, вызывать фагоцитоз эритроцитов макрофагами. Это может быть другой главной причиной анемии. В настоящем изобретении, проточную цитометрию применяли для детектирования способности НМА02h14-48 связываться с эритроцитами человека, чтобы оценить риск от антител. В частности, эритроциты из здоровых
25 доноров инкубировали с разбавленным НМА02h14-48 (максимальная концентрация составляла 667 нМ, всего 8 тестируемых точек концентрации) в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку, при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали три раза и инкубировали со вторичным антителом (меченым PE антителом мыши против Fc IgG человека, Biolegend, номер в каталоге
30 409304) в ФБР, содержащем 2% эмбриональную бычью сыворотку, при 4°C в темноте в течение 30 минут. Клетки промывали три раза ФБР, содержащим 2% эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС), а затем детектировали флуоресцентный

сигнал с помощью проточной цитометрии на Canto II (BD Biosciences). В соответствии со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) сигнала, использовали GraphPad для аппроксимации кривой зависимости от концентрации, и рассчитывали EC₅₀.

5 На Фигуре 10 показано, что максимальная средняя интенсивность флуоресценции HMA02h14-48, связанного с CD47 на поверхности эритроцитов человека, была ниже, чем таковая для контрольного антитела Hu5F9. Максимальная средняя интенсивность флуоресценции и соответствующая EC₅₀ показаны в Таблице 9.

10

Таблица 9. Активность связывания антитела HMA02h14-48 с CD47 на поверхности эритроцитов человека.

	HMA02h14-48	Hu5F9
EC ₅₀ (нМ)	3,9	3,4
Макс MFI	1165	2380

Пример 10. Ингибирование роста опухоли Toledo гуманизированным антителом HMA02h14-48.

15

Цели: создали модель подкожной опухоли у мышей NOD-Scid Toledo, чтобы исследовать противоопухолевую активность антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Способы: клетки Toledo диффузной В-крупноклеточной лимфомы человека
20 (ATCC® CRL-2631™) культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Опухолевые клетки суспендировали в RPMI1640 и имплантировали подкожно в правый бок самцов мышей NOD-Scid (Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.) при дозе 1×10^7 клеток/мышь.

Через 15 дней после инокуляции опухолевых клеток, мышей произвольно
25 делили на 6 групп в соответствии с объемом опухоли, антитела Hu5F9 и HMA02h14-48 разбавляли ФБР, соответственно, и мышам вводили дозу 10 мг/кг, в соответствии с графиком, показанным в Таблице 10. Антитело отрицательного изотипического контроля (изотип) IgG4P приобретали у Shanghai ChemPartner Co., Ltd.

Таблица 10. Схемы введения Hu5F9 и HMA02h14-48.

Тестируемые образцы	Группы	Введенная доза (мг/кг × кратность)	Еженедельная суммарная доза (мг/кг)	Схемы введения	Количество мышей
изотип		10 × 3	30	Интраперитонеальная инъекция в дни 1, 4 и 7	6
Hu5F9	Hu5F9-H	10 × 3	30	Интраперитонеальная инъекция в дни 1, 4 и 7	6
	Hu5F9-L	10 × 1	10	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6
HMA02h14-48	HMA-H	10 × 3	30	Интраперитонеальная инъекция в дни 1, 4 и 7	6
	HMA-M	10 × 2	20	Интраперитонеальная инъекция в дни 1 и 4	6
	HMA-L	10 × 1	10	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6

Примечание: день распределения по группам принимали за 0 день, а следующий день для введения лекарственных средств представлял собой 1 день.

Объемы опухолей (объем опухоли = $0,5 \times \text{длинный диаметр} \times \text{короткий диаметр}^2$) и массу тела мышей регулярно измеряли. Изменения объема опухоли и массы тела анализировали статистически, применяя t-критерий Стьюдента, в программном обеспечении Excel, причем $p < 0,05$ указывало на значимое статистическое различие. Рассчитывали степень регресса опухоли после введения для каждой группы лечения антителом.

Формула для вычисления уровня регресса опухоли в каждой группе лечения приведена далее: $[(\text{средний объем опухоли в } D_0 - \text{средний объем опухоли в } D_t) / \text{средний объем опухоли в } D_0] \times 100\%$.

Формула для вычисления относительной массы тела мыши приведена далее: $(\text{масса тела мыши в день измерения} / \text{масса тела мыши во время распределения по группам}) \times 100\%$.

Результаты:

Результаты эксперимента представлены в Таблице 11 и на Фигуре 11.

Опухоли в группе антитела изотипического контроля росли хорошо, тогда как в группе лечения терапевтическим антителом, объем подкожной опухоли

постепенно уменьшался по сравнению с исходным объемом до полного регресса. В группах, которым вводили антитела Nu5F9 и НМА02h14-48 в различных дозах, достигли эффекта полного регресса опухоли (уровни регресса составляли 100%) при измерении на 11 день, по сравнению с контрольным антителом в контрольной

5 группе, уменьшение объема опухоли было статистически значимым. После прекращения введения доз, за животными наблюдали до 67 дня, и все еще не было признаков возобновления роста опухоли. Кроме того, животные в группах, которым вводили НМА02h14-48 в различных дозах, были в хорошем состоянии, и не было значимого различия в массе тела мышей на 21 день по сравнению с

10 таковой до лечения. Масса тела мышей в группе, которой вводили высокую дозу Nu5F9, на 21 день снизилась приблизительно на 5% по сравнению с таковой на 0 день, но не наблюдали статистически значимого различия по сравнению с исходной массой тела ($p > 0,05$); тем не менее, не наблюдали потери массы тела в группе, которой вводили низкую дозу Nu5F9, позволяя предположить возможное

15 зависимое от дозы действие Nu5F9 на массу тела.

На основании приведенных выше данных, при лечении обоими антителами Nu5F9 и НМА02h14-48 выявили сильно значимое противоопухолевое действие. Одна доза любого антитела при концентрации 10 мг/кг приводила к полному регрессу опухоли, и он длился долго.

20 Таблица 11. Действие Nu5F9 и НМА02h14-48 на рост трансплантированной подкожно опухоли Toledo.

Группы	Количество животных (начало/21 день)	Объем опухоли (мм ³)			Относительная масса тела (%)
		День 0	День 11	День 21	День 21
Изотип	6/6	199 ± 18	1524 ± 238	3646 ± 631	111,3
Nu5F9-H	6/6	200 ± 23	0 ± 0** (100%)	0 ± 0** (100%)	94,5
Nu5F9-L	6/6	196 ± 14	0 ± 0** (100%)	0 ± 0** (100%)	100,3
НМА-H	6/6	199 ± 26	0 ± 0** (100%)	0 ± 0** (100%)	99,1
НМА-M	6/6	199 ± 24	0 ± 0** (100%)	0 ± 0** (100%)	100,3

НМА-L	6/6	199 ± 18	0 ± 0** (100%)	0 ± 0** (100%)	100,4
-------	-----	----------	-------------------	-------------------	-------

Примечание: ** обозначает $p < 0,01$; количества в скобках представляют собой уровни регресса опухоли.

Пример 11. Ингибирование роста опухоли REC-1 гуманизированным антителом НМА02h14-48.

Цели: создали модель подкожной опухоли REC-1 у мышей NOD-Scid, чтобы исследовать противоопухолевую активность антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Способы: клетки REC-1 лимфомы из клеток мантийной зоны человека (ATCC® CRL-3004™) культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку. Опухолевые клетки суспендировали в RPMI1640 и имплантировали подкожно в правый бок самцов мышей NOD-Scid (Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.) в дозе 5×10^6 клеток/мышь.

Через 11 дней после инокуляции опухолевых клеток, мышей произвольно делили на 5 групп в соответствии с объемом опухоли, антитела Hu5F9 и НМА02h14-48 разбавляли ФБР и вводили мышам в соответствии с графиком, представленным в Таблице 12. Антитело Hu5F9 было получено в GenScript, а антитело НМА02h14-48 получали в соответствии со способом, описанным в Примере 2. Антитело изотипического контроля (изотип) IgG4p приобретали у Shanghai ChemPartner Co., Ltd.

Таблица 12. Схемы введения доз Hu5F9 и НМА02h14-48.

Тестируемые образцы	Группы	Введенная доза (мг/кг × кратность)	Суммарная доза (мг/кг)	Схемы введения доз	Колчество во мышей
	Изотип	10 × 1	10	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6
Hu5F9	Hu5F9-M	3 × 1	3	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6

HMA02h14 -48	HMA-L	1×1	1	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6
	HMA-M	3×1	3	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6
	HMA-H	10×1	10	Интраперитонеальная инъекция в 1 день	6

Примечание: день распределения по группам принимали за 0 день, а следующий день для введения лекарственных средств представлял собой 1 день.

Объемы опухолей (объем опухоли = $0,5 \times \text{длинный диаметр} \times \text{короткий диаметр}^2$) и массу тела мышей регулярно измеряли. Рассчитывали уровень ингибирования опухоли и уровни регресса в группе лечения антителом на 12 день после введения.

Формула для вычисления уровня ингибирования опухоли приведена далее: $[(\text{изменение среднего объема опухоли в контрольной группе} - \text{изменение среднего объема опухоли в группе лечения}) / \text{изменение среднего объема опухоли в контрольной группе}] \times 100\%$. Изменения объема опухоли и массы тела статистически анализировали, применяя t-критерий Стьюдента, в программном обеспечении Excel, причем $p < 0,05$ указывало на значимое статистическое различие.

Формула для вычисления уровня регресса опухоли в каждой группе лечения приведена далее: $[(\text{средний объем опухоли в } D_0 - \text{средний объем опухоли в } D_t) / \text{средний объем опухоли в } D_0] \times 100\%$.

Формула для вычисления относительной массы тела мыши приведена далее: $(\text{масса тела мыши в день измерения} / \text{масса тела мыши во время распределения по группам}) \times 100\%$.

Результаты:

Результаты эксперимента представлены в Таблице 13 и на Фигуре 12.

Через 12 дней после введения, по сравнению с группой Изотипа, уровень ингибирования роста опухоли составлял 16,7% ($p > 0,05$) в группе, которую лечили разовой дозой Nu5F9 при концентрации 3 мг/кг; и уровни ингибирования роста опухоли составляли 3,8% ($p > 0,05$), 54,7% ($p < 0,01$) и 107,2% ($p < 0,001$),

соответственно, в группах, которым вводили разовую дозу НМА02h14-48 при концентрации 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг. В группах, которых лечили высокой дозой антитела НМА02h14-48, добивались полного регресса опухоли (уровней регресса 100%) на 10 день. Кроме того, не наблюдали значимого различия относительной массы тела мышей в различных группах лечения.

В совокупности, у антитела НМА02h14-48 выявили зависимое от дозы действие в модели REC-1, и разовая доза при концентрации 10 мг/кг приводила к полному регрессу опухоли.

Таблица 13. Действие Nu5F9 и НМА02h14-48 на рост имплантированной подкожно опухоли REC-1.

Группы	Количество животных (начало/12 день)	Объем опухоли (мм ³)		Уровень ингибирования опухоли (%)	Относительная масса тела (%)
		День 0	День 12	День 12	День 12
Изотип - 10 мг/кг	6/6	226 ± 50	3403 ± 570	-	111,8
Nu5F9 - 3 мг/кг	6/6	227 ± 49	2875 ± 659	16,7	112,1
НМА02h14-48 - 1 мг/кг	6/6	225 ± 36	3283 ± 889	3,8	111,0
НМА02h14-48 - 3 мг/кг	6/6	224 ± 52	1664 ± 890	54,7**	109,7
НМА02h14-48 - 10 мг/кг	6/6	228 ± 65	0 ± 0 (100%)	107,2**	101,2

Примечание: ** обозначает $p < 0,01$; количества в скобках представляют собой уровни регресса опухоли.

Последовательности в соответствии с настоящим изобретением:

SEQ ID NO: 1	QVQLQQSGTELA KPGASVKMSCKASGYTFTSYMHVWKQRPG QILEWIGYIDPANDYSDYNQNFKD KATLTADKSSRTTYMQLTSLT SEDSAVYYCARLG YGNSSPFDYWGQGTTLVSS
SEQ ID NO: 2	DIKMTQSPSSMYASVGERVTITCKASQDIHNYLSW FQQKPGKS PKTLIYRAKRLVDGVPLRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYFC LQYDELYTFGGGT RLEIK
SEQ ID NO: 3	QVQLQQSGTELA KPGASVKMSCKASGYTFTSYMHVWKQRP GQILEWIGYIDPANDYSDYNQNFKD KATLTADKSSRTTYMQLTS

	LTSEDSAVYYCARLGYGQSSPFDYWGGTTLIVSS
SEQ ID NO: 4	DIKMTQSPSSMYASVGERVTITCKASQDIHNYLSWFQQKPGKS PKTLIYRAKRLVEGVPLRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYFC LQYDELYTFGGGTRLEIK
SEQ ID NO: 5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAP GQGLEWMGYIDPANDYSDYNQNFKDRVTITADKSTRTAYMELT SLRSEDYAVYYCARLGYGQSSPFDYWGGTTVTVSS
SEQ ID NO: 6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAP GQGLEWMGYIDPANDYSDYNQNFKDRVTITADKSTRTTYMELT SLRSEDYAVYYCARLGYGQSSPFDYWGGTTVTVSS
SEQ ID NO: 7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAP GQGLEWMGYIDPANDYSDYNQNFKDRATLTADKSTRTTYMELT SLRSEDYAVYYCARLGYGQSSPFDYWGGTTVTVSS
SEQ ID NO: 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNYLSWFQQKPGKAP KSLIYRAKRLVEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCL QYDELYTFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNYLSWFQQKPGKAP KSLIYRAKRLVEGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCL QYDELYTFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 10	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNYLSWFQQKPGKAP KTLIYRAKRLVEGVPLRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYFCL QYDELYTFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 11	SYMH
SEQ ID NO: 12	YIDPANDYSDYNQNFKD
SEQ ID NO: 13	LGYNSSPFDY
SEQ ID NO: 14	KASQDIHNYLS
SEQ ID NO: 15	RAKRLVD
SEQ ID NO: 16	LQYDELYT
SEQ ID NO: 17	LGYGQSSPFDY
SEQ ID NO: 18	RAKRLVE
SEQ ID NO: 19	CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGACTGAACTGGCAAACC CGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGGTACA CGTTTACTAGTTATTATATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCT GGACAAATTCTGGAGTGGATTGGATACATTGATCCTGCCAA TGATTATAGTGACTACAATCAGAATTTCAAGGACAAGGCCA CATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGGACAACCTACATGCA ACTGACCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATT GTGCAAGATTGGGCTACGGTAATAGCTCCCCTTTTGACTACTG GGCCAAGGCACCACTCTCATAGTATCTTCA
SEQ ID NO: 20	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCT GTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGG ACATTCATAACTATTTAAGTTGGTTCCAGCAGAAACCAGGG AAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAAAAGATTGGT AGATGGGGTCCCATTAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGC AAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGAT

	ATGGGAATTTATTTTTGTCTACAGTATGATGAGTTGTACACG TTCGGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATAAAA
SEQ ID NO: 21	LGYGXSSPFDY (X может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно N, или Q, или H, D, K, R, или E, или их консервативные аминокислотные замены)
SEQ ID NO: 22	RAKRLVX (X может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно D, или E, или N, или Q, или их консервативные аминокислотные замены)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

5 (1) от одного до трех HCDR, выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), причем последовательность аминокислот указанной VH является таковой, как представлена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7; и/или

(2) от одного до трех LCDR, выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3
10 варибельной области легкой цепи (VL), причем последовательность аминокислот указанной VL является таковой, как представлена в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH и

15 LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL, причем указанные VH и VL выбраны из:

(1) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2;

(2) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ
20 ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, 9 или 10;

25 (4) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9 или 10; или

(5) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в
30 SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

3. Выделенное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

(1) от одного до трех HCDR, выбранных из определяющего комплементарность участка тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, причем
5 указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, или 17, или 21; и/или

10 (2) от одного до трех LCDR, выбранных из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 15, или 18, или 22, и указанный LCDR3 содержит
15 последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, содержащие

(1) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность
20 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, или 17, или 21; и/или

(2) определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LCDR1),
25 LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 15, или 18, или 22, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16.

30

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 3, отличающиеся тем, что

(1) указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:

5 17; и/или

(2) указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 18, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:

10 16.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 3, содержащие

(1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 или 7; и/или

(2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 или 10.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6 и 7, и указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9 и 10.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем указанные VH и VL выбраны из

(1) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1; и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2;

5 (2) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3; и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5; и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, 9 или 10;

10 (4) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6; и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9 или 10; или

(5) VH, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7; и VL, содержащей последовательность аминокислот, представленную в
15 SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8.
20

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 9, содержащие константную область тяжелой цепи, такую как константная область IgG1 человека, константная область IgG1TM человека, константная область IgG4 человека или константная область IgG4P человека.
25

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 10, содержащие константную область легкой цепи, такую как константная область легкой цепи к человека.
30

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 11, которые представляют собой антитело мыши, химерное антитело или гуманизированное антитело.

5 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 12, которые представляют собой полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, однодоменное антитело, такое как VHH, Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')₂, одноцепочечное антитело, такое как scFv, Fv, dAb (доменное антитело) или би/мульти-специфичное антитело.

10 14. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 13.

15 15. Рекombинантный вектор или вектор экспрессии, содержащий одну или более нуклеиновых кислот по п. 14, причем указанный вектор подходит для рекombинантной продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 13.

20 16. Клетка-хозяин, содержащая один или более рекombинантных векторов или векторов экспрессии по п. 15.

17. Иммуноконъюгат или иммунная слитая молекула, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 13.

25 18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 13, нуклеиновую кислоту по п. 14, вектор по п. 15, клетку-хозяина по п. 16, или иммуноконъюгат или иммунную слитую молекулу по п. 17, и необязательно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

30 19. Способ лечения или предотвращения рака, включающий введение индивиду эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего

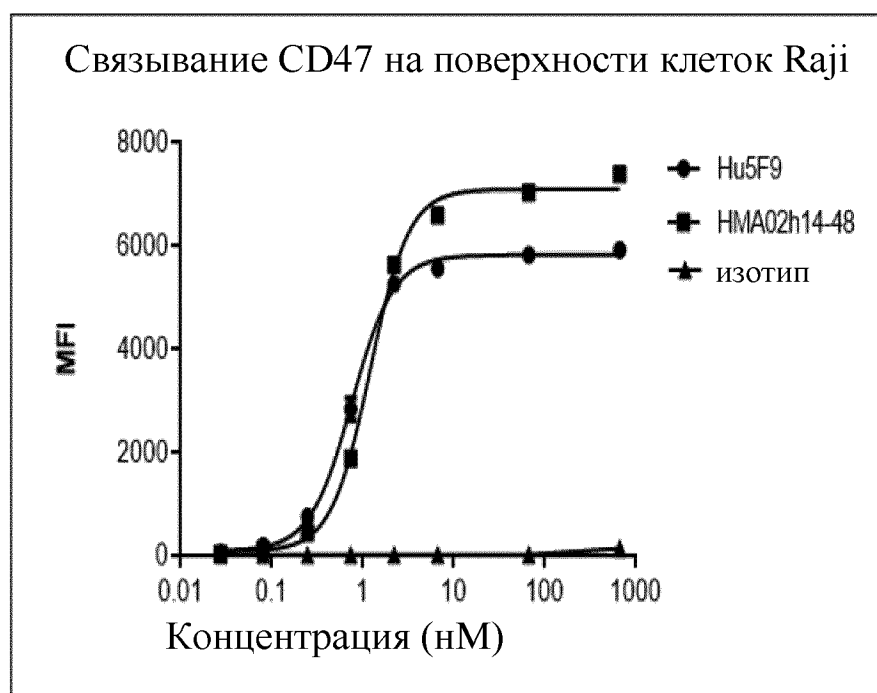
фрагмента по любому из пп. 1 - 13, нуклеиновой кислоты по п. 14, вектора по п. 15, клетки-хозяина по п. 16, иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы по п. 17, или фармацевтической композиции по п. 18.

5 20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что рак указанный включает гематологический рак и солидную опухоль, такие как рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, лимфома, лейкоз, множественная миелома, (злокачественная) меланома, лейомиома, лейомиосаркомы, глиома, глиобластома, миелома, рак эндометрия, карцинома почки, (доброкачественная) меланома, рак
10 предстательной железы, карцинома щитовидной железы, рак шейки матки, рак желудка, рак печени, рак толстого кишечника, рак яичника, уротелиальная карцинома, и так далее.

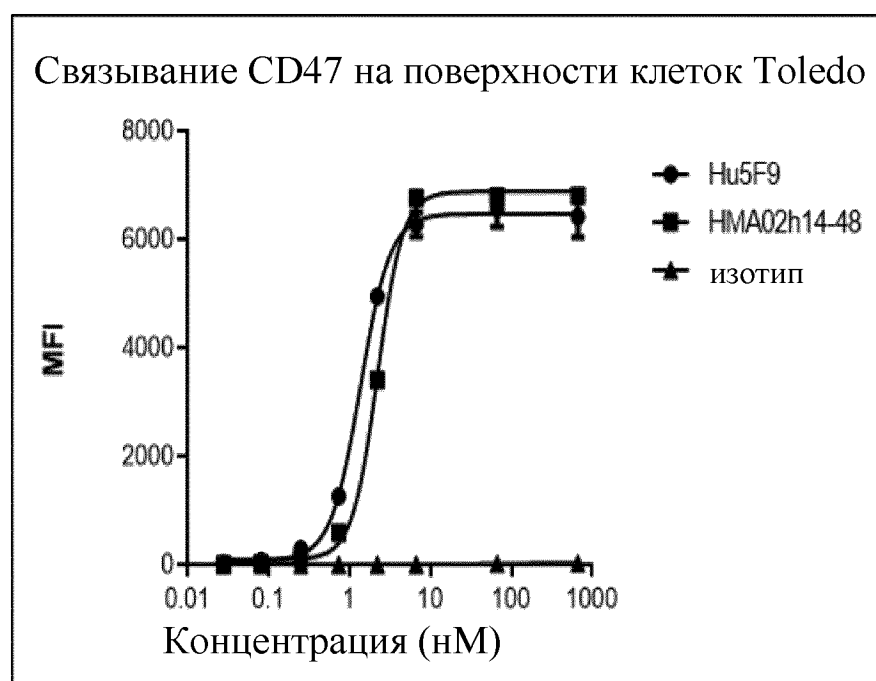
21. Способ детектирования белка CD47 в образце, включающий:

15 (a) приведение в контакт образца с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1 - 13 или иммуноконъюгатом или иммунной слитой молекулой по п. 17; и

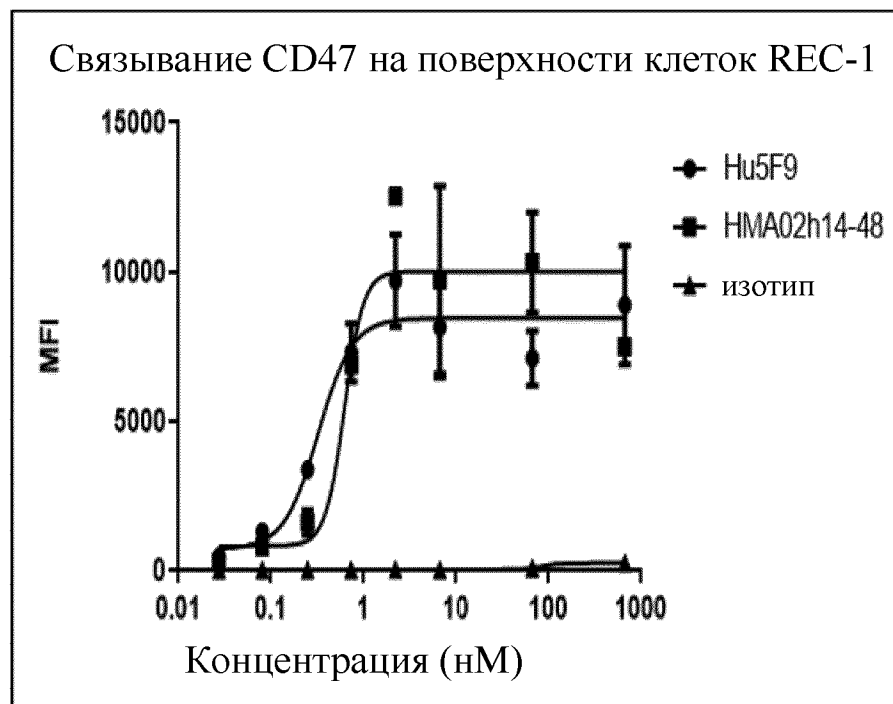
20 (b) детектирование образования комплекса между указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или иммуноконъюгатом или иммунной слитой молекулой и белком CD47.



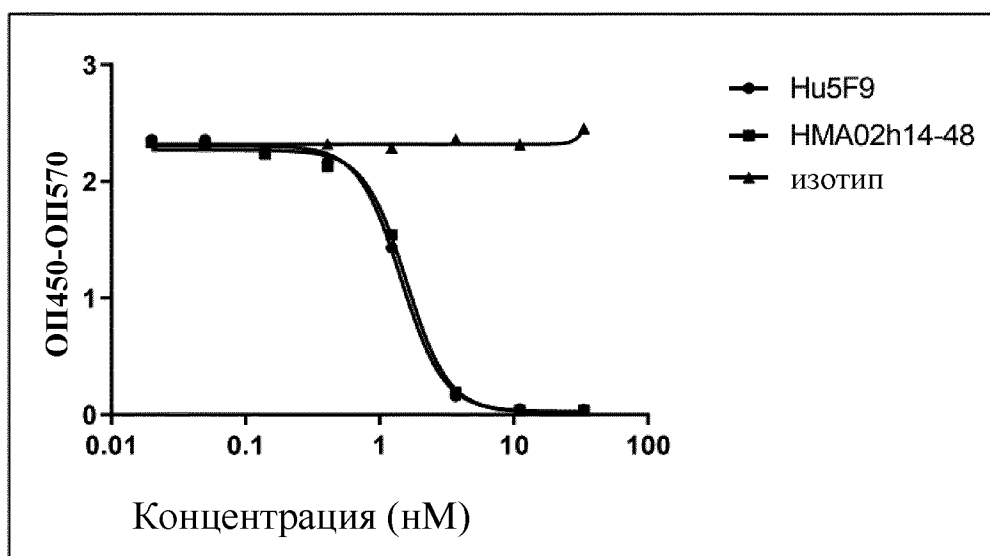
Фиг. 1



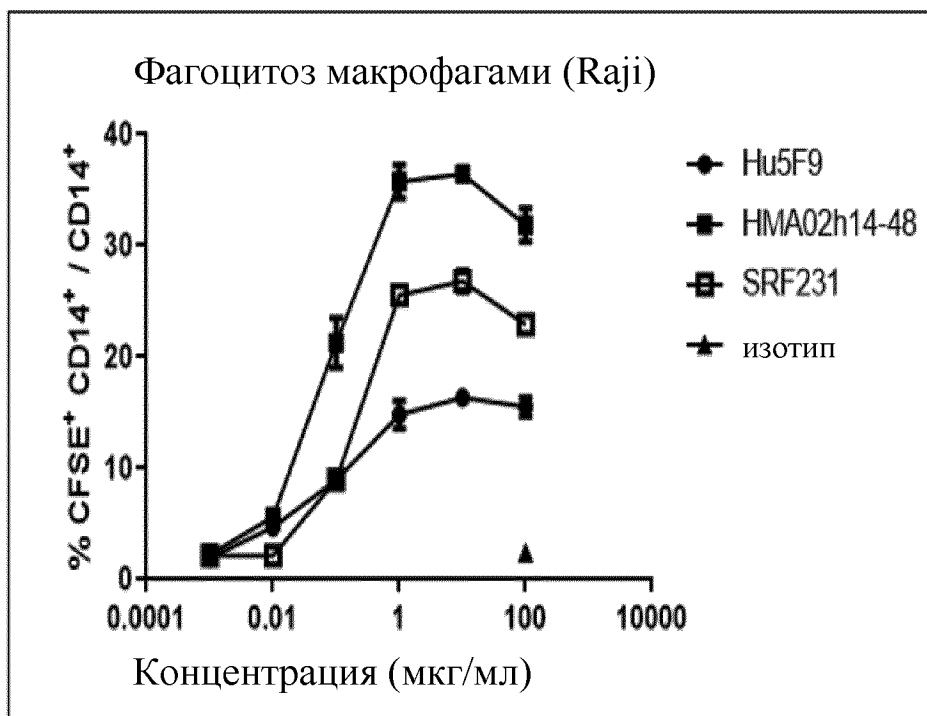
Фиг. 2



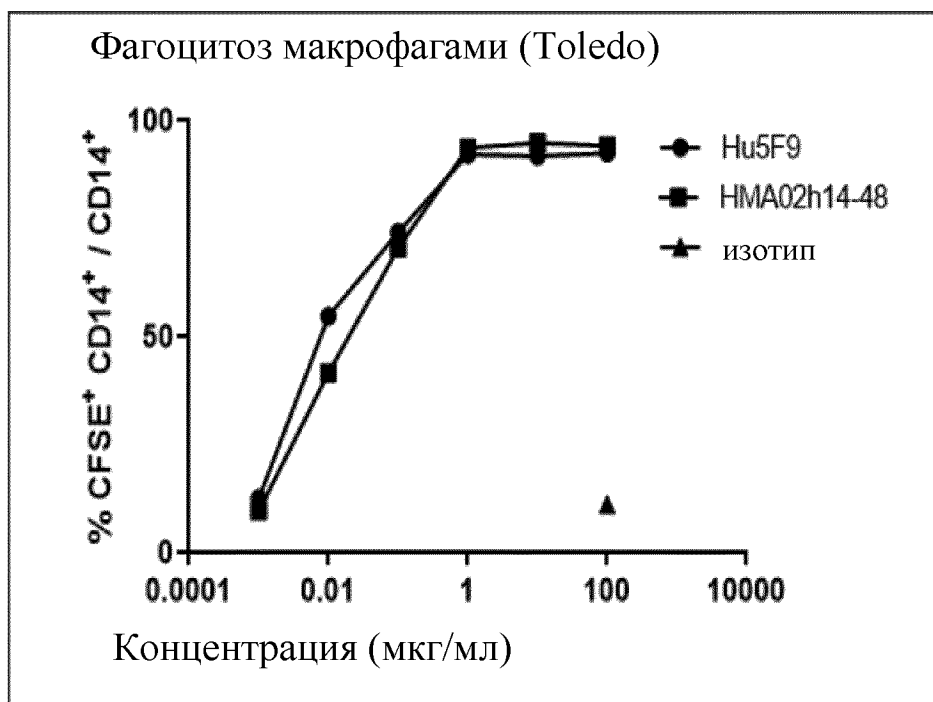
Фиг. 3



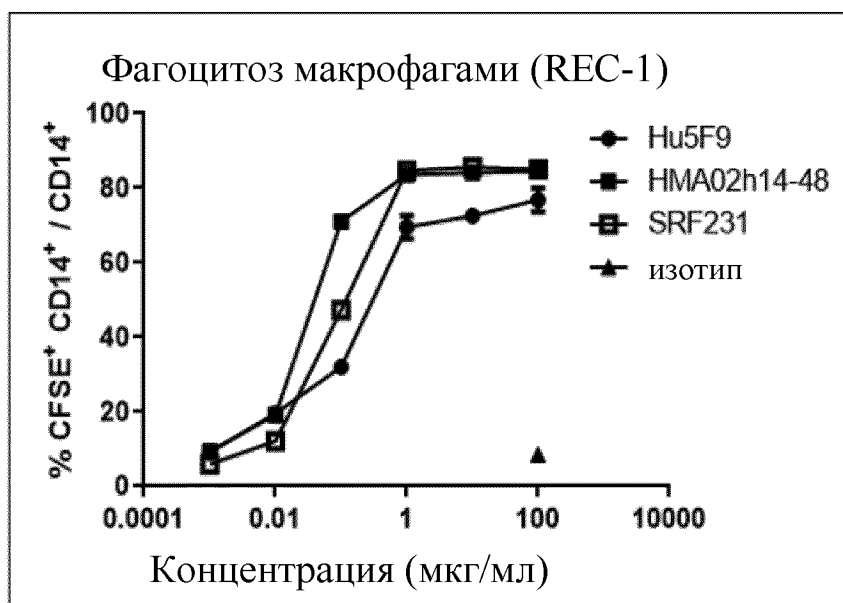
Фиг. 4



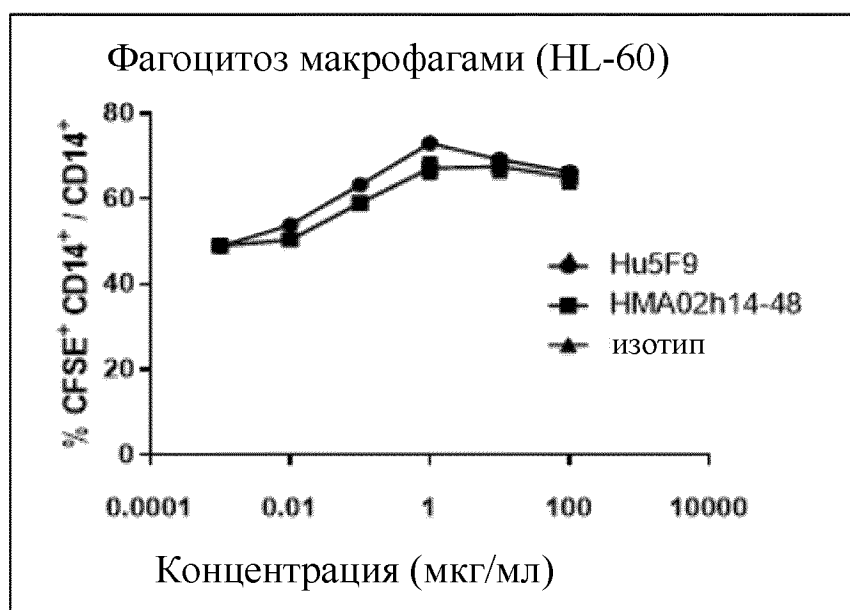
Фиг. 5



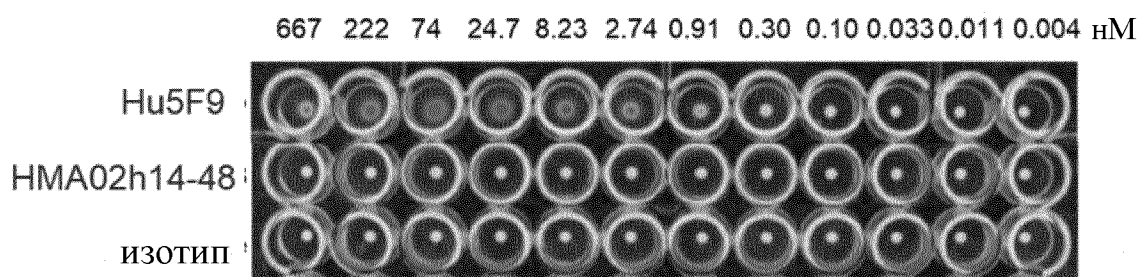
Фиг. 6



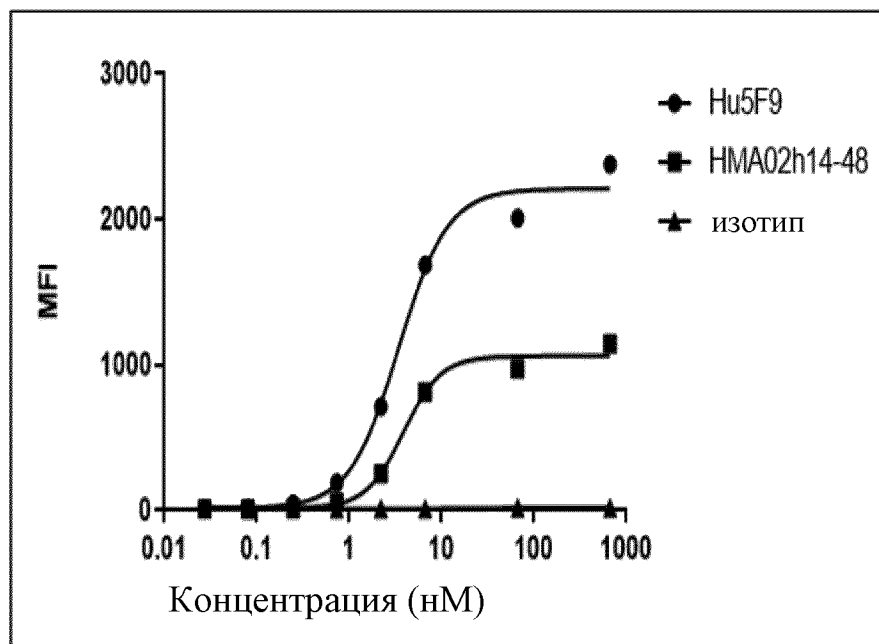
Фиг. 7



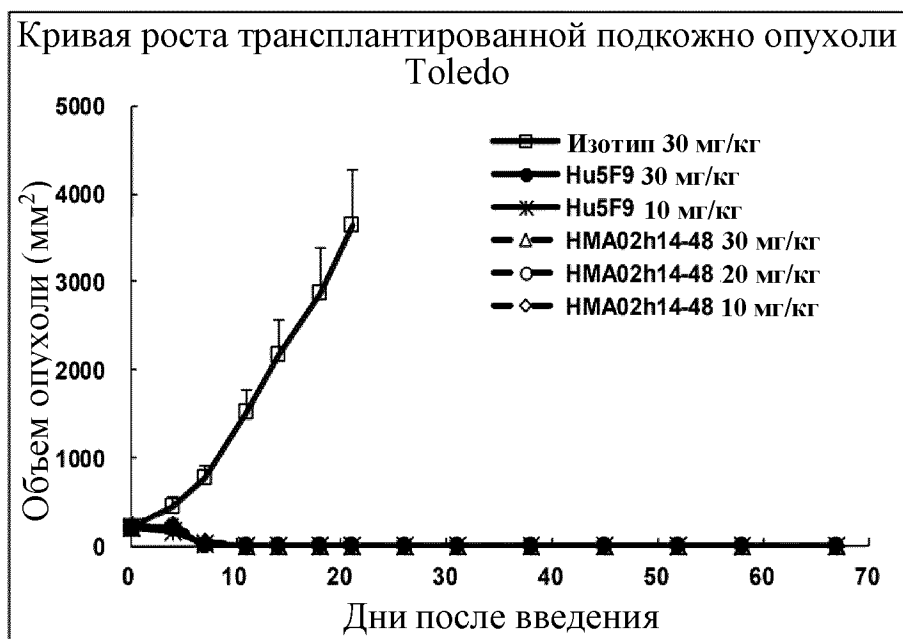
Фиг. 8



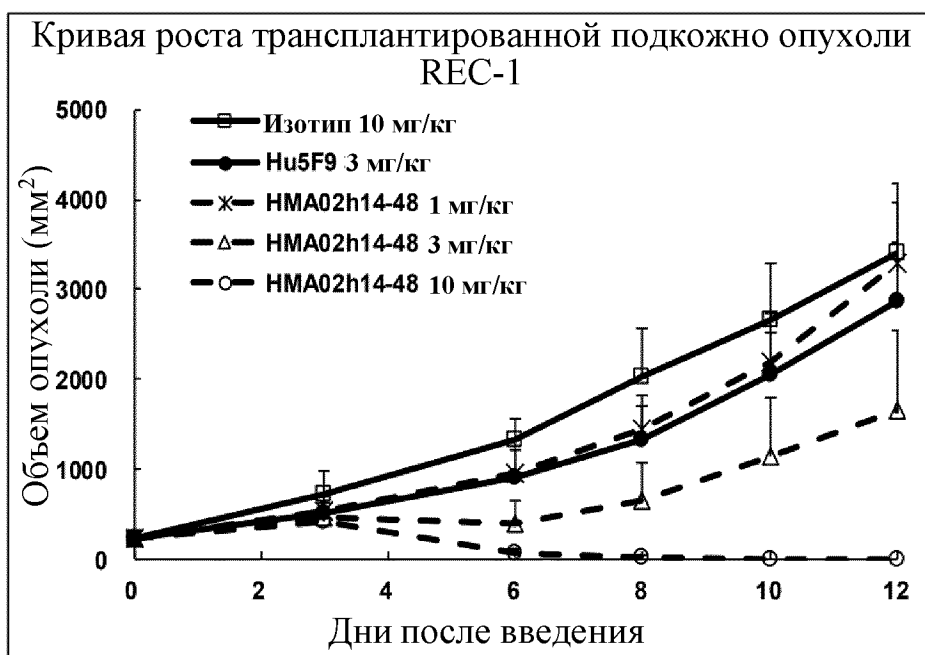
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12